

Synthese der Bacteriocine Amylocyclin A und Plantazolicin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl. Biologin Romy Scholz

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Rainer Borriss
 2. PD Dr. Joachim Vater
 3. Prof. Dr. Roderich Süßmuth

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2011

Zusammenfassung

Bacillus amyloliquefaciens FZB42 ist ein grampositives Bodenbakterium. Es kann in der Rhizosphäre das Wachstum von Pflanzen fördern und durch die Produktion von Sekundärmetaboliten phytopathogene Organismen hemmen.

Aus der Genomanalyse und den dazugehörigen Arbeiten war bekannt, dass *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 nicht-ribosomal je drei antimikrobielle Polyketide und Lipopeptide herstellt, sowie zwei Siderophore und das Dipeptid Bacilysin (8, 12, 45).

Für *Bacillus* typische Lantibiotika oder große Bacteriocine wurden nicht gefunden (9).

In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 auf ribosomale Weise antibakterielle Peptide herstellt. Zwei bisher unbekannte Bacteriocine, Amylocyclicin A und Plantazolicin, und deren dazugehörigen Gencluster konnten identifiziert und charakterisiert werden.

Amylocyclicin A ist ein unmodifiziertes Peptid, dessen N- und C-Terminus kovalent verbunden sind. Es wurde der Gruppe I der zirkulären Bacteriocine zugeordnet, dessen Mitglieder sich durch schwache Homologie untereinander, aber durch wahrscheinlich ähnliche 3D-Strukturen auszeichnen. Die Masse beträgt 6382 Da $[M+H]^+$ und die Substanz ist stark aktiv gegen grampositive Bakterien. Das Biosynthesecuster umfasst sechs Gene für die Synthese, den Export, die Zyklisierung und die Immunität.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass SigW in *Bacillus subtilis* Resistenz gegenüber Amylocyclicin A vermittelt, und dass hierbei das SigW-kontrollierte Operon *ydbST* für die Ausbildung dieser Resistenz verantwortlich ist.

Plantazolicin ist ein hydrophobes, stark modifiziertes Peptid aus der TOMM-Gruppe, einer Gruppe aus Microcin B17-ähnlichen Peptiden, die nach neueren Erkenntnissen verbreiteter ist, als bisher bekannt. Plantazolicin ist schwach aktiv gegen grampositive Bakterien und besitzt die Masse 1336 Da $[M+H]^+$. Das Biosynthesecuster umfasst zwölf Gene, mit allen nötigen Genen für Synthese, Modifikation, Regulation, Immunität und Export.

Inhalt:

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	1
1.2	Bacteriocine grampositiver Bakterien	2
1.2.1	Zirkuläre Bacteriocine grampositiver Bakterien.....	3
1.3	TOMM Gruppe - Thiazol/Oxazol-modifizierte Microcine	8
1.3.1	Microcin MccB17	8
1.3.2	TOMM-Cluster	11
1.4	Zielsetzung.....	14
2	Material	15
2.1	Stämme	15
2.2	Plasmide.....	17
2.3	Oligonukleotide	18
2.4	Chemikalien	20
2.5	Antibiotika	21
2.6	Enzyme	21
2.7	Kits.....	22
2.8	Kulturmedien	22
2.9	Puffer, Gele und Lösungen	23
2.9.1	Für die Zellbiologie	23
2.9.2	Für molekularbiologische Methoden.....	24
2.9.3	Für die Protein-Gelelektrophorese.....	24
2.10	Software	25
2.11	Apparaturen	26
3	Methoden	28
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	28
3.1.1	Kultur von Bakterien	28
3.1.2	Transformation in CaCl ₂ kompetente <i>E.coli</i> DH5α	28
3.1.3	Herstellung kompetenter <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Zellen	28
3.1.4	Transformation von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	29
3.1.5	Oberflächenextraktion von Plantazolicin.....	29
3.1.6	Amylocyclicin A Gewinnung	30
3.1.7	Aktivitätstests	30
3.1.8	Herstellung von Transposonmutanten	31
3.1.9	Transposonmutantenscreening.....	31
3.2	Molekularbiologische Methoden	32

3.2.1	Restriktion von DNA	32
3.2.2	Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)	32
3.2.3	Dephosphorilieren von DNA	34
3.2.4	Polyadenylierung von DNA-Enden durch <i>Taq</i> -Polymerase	34
3.2.5	Phosphorilieren von DNA	34
3.2.6	Ligation	35
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.2.8	Plasmidextraktion	36
3.2.9	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Bacillus</i>	36
3.2.10	Bestimmung des Insertionsortes des Transposons	37
3.2.11	Auffüllen von „sticky ends“	37
3.2.12	Aufreinigen von DNA	37
3.2.13	Konstruktion von Integrationsplasmiden	38
3.3	Biochemische Methoden	38
3.3.1	SDS-PAGE	38
3.3.2	PAS- Färbung zum Nachweis von Glycoproteinen auf PAA-Gelen	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Amylocyclicin A	40
4.1.1	Antibakterielle Aktivität der <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 <i>sfp</i> - Mutanten CH3 und RS6 gegen <i>Bacillus subtilis</i> HB0042	40
4.1.2	Gencluster um <i>RBAM_029230</i>	42
4.1.3	Vergleich des Amylocyclicin A-Clusters mit dem Uberolysin-Gencluster	50
4.1.4	Selbst-Immunität gegenüber Amylocyclicin A	52
4.1.5	Amylocyclicin A hat starke Aktivität gegen grampositive Bakterien	54
4.1.6	SigW in <i>Bacillus subtilis</i> ist in die Resistenz gegenüber Amylocyclicin A und andere Substanzen von <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 involviert	55
4.1.7	Amylocyclicin A-ähnliche zirkuläre Bacteriocine in anderen Bakterien	57
4.2	Plantazolicin	60
4.2.1	Identifizierung einer Substanz mit der Masse 1336 [M+H] ⁺	60
4.2.2	Detektion von Thiopeptidsynthesegenen im Genom von <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> FZB42	63
4.2.3	Funktionelle Analyse des Plantazolicin-Biosyntheseclusters	64
4.3	Hinweise auf weitere mögliche Bacteriocine	74
5	Diskussion	79
	Literaturverzeichnis	91
	Anhang	98
	Danksagung	98
	Publikationsliste	99
	Selbstständigkeitserklärung	100

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
ad	auffüllen auf
AIX	Ampicillin, IPTG, X-Gal
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
bp	Basenpaare
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Erythromycin
EtOH	Ethanol
FastAP™	Alkaline Phosphatase
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Broth-Medium
LC-ESI-MS	Flüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisation -Massenspektrometrie
M	Molar
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations Massenspektrometrie

MeOH	Methanol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
ng	Nanogramm
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	open-reading frame
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKS	Polyketidsynthase
PNK	T4 Polynucleotid Kinase
RBS	Ribosomen-Bindungsstelle (<i>ribosome-binding site</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
spc	Spectinomycin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TOMM	Thiazol/Oxazol modifiziertes Microcin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit)
ÜN	über Nacht
V	Volt
v	Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
X ^R	Resistenz gegenüber Antibiotikum X

1 Einleitung

1.1 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42

Bacillus amyloliquefaciens FZB42 ist ein grampositives Bodenbakterium und kann in der Rhizosphäre das Wachstum von Pflanzen fördern und durch die Produktion von Sekundärmetaboliten phytopathogene Organismen hemmen (8-11).

8,5% des 3,918 Mb großen Genoms kodieren für die nicht-ribosomale Synthese von Antibiotika und Siderophoren (9). *B. amyloliquefaciens* FZB42 produziert die antibakteriellen Polyketide Bacillaene, Difficidin und Macrolactin, die durch große Polyketidsynthasen (PKS) hergestellt werden, sowie die durch große nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) hergestellten Lipopeptide Bacillomycin D, Fengycin und Surfactin. Hinzu kommen die Siderophore Bacillibactin und das vermutliche Produkt des *nrs*-Clusters, sowie das Dipeptid Bacilysin (8, 9, 12, 45).

Die Gencluster für die Synthese von Fengycin, Surfactin, Bacillaene, Bacilysin und Bacillibactin sind auch in dem verwandten Modellstamm *Bacillus subtilis* 168 vorhanden. Diese Substanzen können jedoch bis auf Bacilysin nicht hergestellt werden, da das für die Synthese benötigte Gen *sfp* defekt ist. Im Gegensatz zu *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 fördert *Bacillus subtilis* 168 nicht das Pflanzenwachstum und gehört nicht zu den PGPR (Plant Growth Promotion) Bakterien.

Pro Gramm feuchter Erde gibt es 10^9 - 10^{10} Mikroorganismen, die, um ihr Überleben zu sichern und ihre Nische aufrecht zu erhalten, antimikrobielle Substanzen herstellen, welche das Wachstum der Konkurrenz hemmen. Bodenbakterien sind deshalb eine reiche Quelle an möglichen Antibiotika für kommerziellen und medizinischen Nutzen (6).

Aufgrund der außergewöhnlich vielfältigen Produktion antimikrobieller Substanzen und seiner Fähigkeit das Pflanzenwachstum zu fördern, ist *B. amyloliquefaciens* FZB42 ein besonders interessantes Objekt der Forschung.

1.2 Bacteriocine grampositiver Bakterien

Bacteriocine sind ribosomal hergestellte antimikrobielle Peptide, die gegen nah verwandte Bakterien wirksam sind (60). Sie zeichnen sich durch ihre starke antibakterielle Aktivität und eine schwache Resistenzausbildung aus (58). Aufgrund dieser Eigenschaften wird besonders an deren Einsatz in der Lebensmittelkonservierung und in der Medizin geforscht (60), da sie als unbedenklich gelten.

Bacteriocine sind normalerweise relativ klein (12-100AS) und oft amphiphil (30). Ein häufiger Angriffspunkt der Bacteriocine ist eine Permeabilisierung der Zellmembran (67). Jedoch gibt es auch weitere Mechanismen wie die Hemmung der Nukleinsäuresynthese, Proteinsynthese, Enzymaktivität und Zellwandsynthese (4).

Die Bacteriocine grampositiver Bakterien werden in drei bis vier Klassen unterteilt, je nachdem, ob die zirkulären Bacteriocine eine eigene Klasse IV bilden oder zu der Klasse II gezählt werden (58, 60, 65, 72).

Klasse I: Lantibiotika; kleine (<5 kDa) posttranslational modifizierte hitzestabile Peptide mit ungewöhnlichen Aminosäuren wie Lanthionin

Ia: elongierte kationische Moleküle mit einer flexiblen Struktur in Lösung

Ib: Peptide mit starrer globulärer Struktur

Klasse II: Hitzestabile Nicht-Lantibiotika (<10 kDa) ohne Modifikationen

IIa: Pediocin ähnliche Peptide: klein, 37-48 AS, kationisch, antilisterial, hohe Sequenz-Identität (40-70%), Konsensussequenz im hydrophilen N-Terminus YGNGVXC

IIb: Zwei-Peptid Bacteriocine: Zusammenarbeit beider Peptide für volle Aktivität notwendig

IIc: Bacteriocine ohne Leader-Peptid

Klasse III: große Bacteriocine

IIIa: Bacteriolysine

IIIb: Nicht-lytische Proteine

Klasse IV/IIId: Zirkuläre Bacteriocine: kovalente Bindung zwischen N- und C-Terminus

1.2.1 Zirkuläre Bacteriocine grampositiver Bakterien

1.2.1.1 Beispiele zirkulärer Bacteriocine

Zirkuläre Bacteriocine sind nicht-modifizierte Peptide, deren N- und C-Terminus kovalent miteinander verbunden sind. Sie werden ribosomal durch Translation hergestellt und sind zwischen 58 und 78 AS lang. Die Namensgebung „circular“ erfolgte zur Unterscheidung von den zyklischen „cyclic“ nicht-ribosomal hergestellten Peptiden (58).

Die bisher bekannten Vertreter sind AS-48, Gassericin A, Reuterin 6, Acidocin B, Butyrivibriocin AR10, Uberolysin, Lactocyclicin Q, Carnocyclin A und Circularin A (Abbildungen 1- 2, Tabelle 1).

Subtilisin A ist zwar auch zirkulär, gehört aber aufgrund einzigartiger Thioetherbrücken zwischen einem Cystein-Schwefelatom und dem α -Kohlenstoffatom anderer Restgruppen nicht in diese Gruppe mit hinein und bildet eine eigene Gruppe bzw. wird zur Klasse I (Lantibiotika) gezählt (58).

Tabelle 1 Übersicht über zirkuläre Bacteriocine, modifiziert aus Maqueda et al. (58)

Bacteriocin	Quelle	Leader	Aminosäuren (Masse in Da)	Referenz
Klasse IV				
AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i> S-48	35	70 (7150)	Galvez et al. (26)
Gassericin A	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	33	58 (5652)	Kawai et al. (41)
Reuterin 6	<i>Lactobacillus reuteri</i> LA6	33	58 (5652)	Toba et al. (88)
Acidocin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	33	58 (5620*)	Leer et al. (54)
Butyrivibriocin AR10	<i>Butyrivibrium fibrisolvens</i> AR10	22	58 (5981.5)	Kalmokoff & Teather (39)
Uberolysin	<i>Streptococcus uberis</i> 42	6	78 (7048)	Wirawan et al. (95)
Circularin A	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 25752	3	69 (ND)	Kemperman et al. (44)
Klasse I				
Subtilisin A	<i>Bacillus subtilis</i>	8	35 (3399.7)	Kawulka et al. (42)

* vorgeschlagenes Molekulargewicht, ND: nicht bestimmt

Die Länge der Leader-Peptide differiert von drei Aminosäuren bei Circularin A bis 35 Aminosäuren bei Enterocin AS-48, wobei deren Sequenzen keine Homologie untereinander aufweisen (Abbildung 1 und Tabelle 1).

Der genaue Mechanismus und die beteiligten Proteine, die zum Abschneiden des Leaderpeptids und zum Ringschluss führen, sind noch unbekannt.

Der Ringschluss stabilisiert die bioaktive Konformation und macht die Bacteriocine unempfindlicher gegenüber Proteolysis.

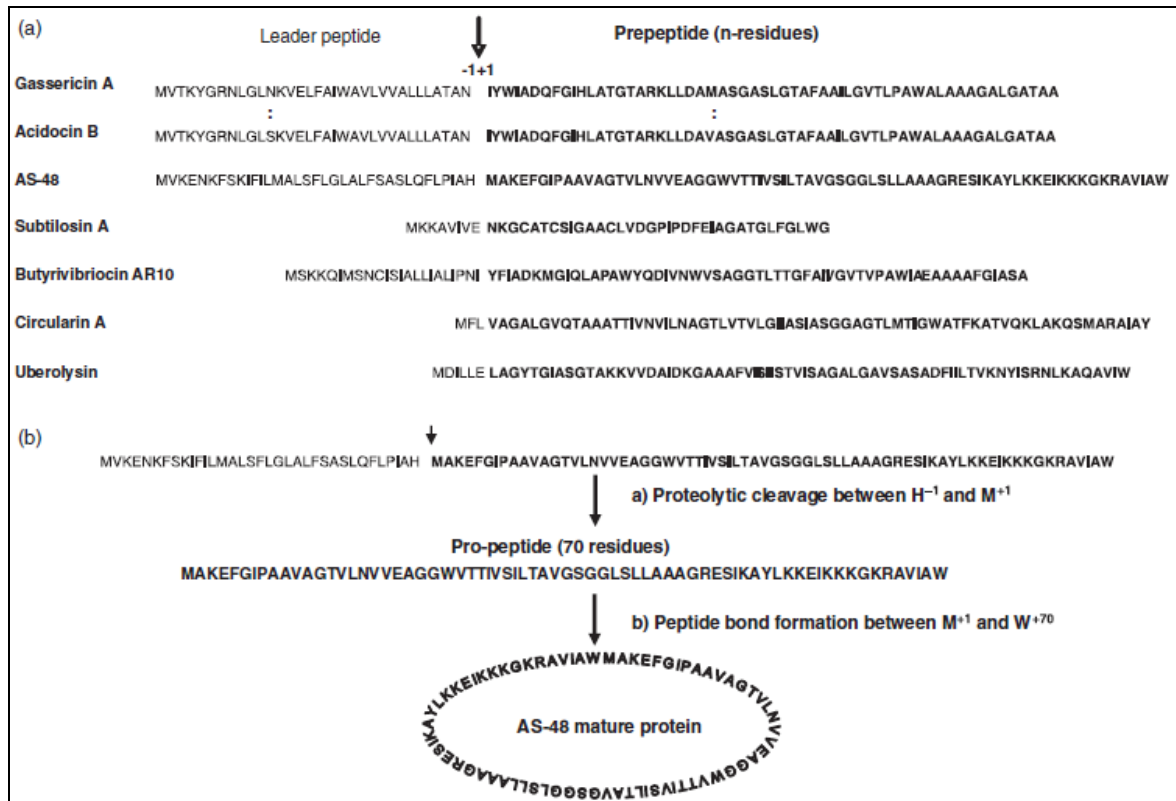


Abbildung 1 aus Maqueda et al. (58) (a) Von der Nukleotidsequenz der Strukturgene abgeleitete Aminosäuresequenzen der verschiedenen Präpeptide; (b) Hypothetische Reifeprozedur für Präpeptide gezeigt am Beispiel der AS-48 Reifung. Zuerst findet eine proteolytische Spaltung zwischen H⁻¹ und M⁺¹ statt, gefolgt von der Bildung einer Peptidbindung zwischen M⁺¹ und W⁺⁷⁰, wobei das reife zirkuläre AS-48 Peptid mit der Kopf- Schwanz-Verknüpfung entsteht

Nach Martin-Visscher et al. und ihren Untersuchungen zur 3D-Struktur von Carnocyclin A (CclA) aus *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 (59) und Cotter et al. (15) werden die zirkulären Bacteriocine in zwei Gruppen eingeteilt (Abbildung 2):

Gruppe I beinhaltet die recht unterschiedlichen Bacteriocine CclA, Lactocyclin Q, AS-48, Circularin A und Uberolysin.

Gruppe II beinhaltet die sehr homologen Bacteriocine Gassericin A, Reuterin 6 und Butyrivibriocin AR10.

Obwohl die Vertreter der Gruppe I (pI~10) keine Homologie zueinander aufweisen, besitzen sie jedoch wahrscheinlich eine ähnliche globuläre 3D-Struktur mit vier bis fünf Helices (59).

Sie haben einen hydrophoben Kern und tragen eine positive Ladung auf ihrer Oberfläche. Durch die positive Ladung können sie von der anionischen Lipidmembran angezogen werden und dort ihre spezifische Wirkungsweise ausüben.

Die Vertreter der homologen Gruppe II besitzen vermutlich eine ähnliche globuläre 3D-Struktur mit vier Helices, jedoch enthalten diese Peptide mehr saure Reste und haben einen niedrigeren pI von ~5 (59).

(A) Group i

CclA	--LVAYGIAQGTAEKVVS LINAG---LTVGSIIS--ILG-G-----VTVGLSGVFTAVKAAIAKQGIKKAIQL	(60)
LactQ	LIDHLGAPRWAVDTILGAIAGV-----NLASWVL-ALVPG-PGWAVKAGLATAAAIVKH-----QGKAAAAAW	(61)
AS-48	MAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWTTIVSILT-AVSGSGLSLLAAAGRESIKAYLKKEIKKKGKRAVI AW	(70)
CirA	VAGALGVQTAAATTIVNVILNAGTLVTVLGI IA-SIASGGAGTLMTIGWATFKATVQK-LAKQSMARAIAY	(69)
Uber	LAGYTGIASGTAKKVVD AIDKGAAAFVIISIISTVISAGALG-AVSASADFIILT VKNYISRNLKAQAVIW	(70)

* : . : . : : * . : : : .

(B) Group ii

GassA	IYWIADQFGIHLATGTARKLLDAMASGASLGTAF AAILGVTLPAWALAAAGALGATAA	(58)
Reut6	IYWIADQFGIHLATGTARKLLDAMASGASLGTAF AAILGVTLPAWALAAAGALGATAA	(58)
B-AR10	IYFIADKMG IQLAPAWYQDIVNWVSAGGTLTTGFAIIVGVTVPAWIAEAAAAFGIASA	(58)

** : ** : : ** : ** . : : : : : : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

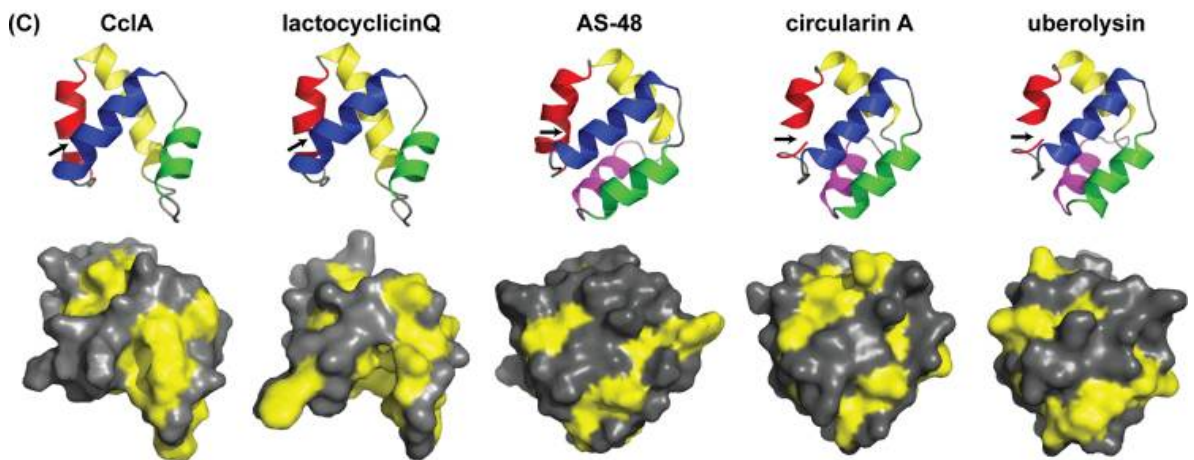


Abbildung 2 aus Martin-Visscher et al. (59) Sequenzvergleich und vorhergesagte Sekundärstruktur für Gruppe I und Gruppe II zirkuläre Bacteriocine. Sequenzen wurden in Gruppe I (A) und II (B) eingeordnet, wie von Cotter et al. (15) vorgeschlagen und durch ClustalW (51) bestimmt wurde. In pink hervorgehobene Reste sind als helikal vorhergesagt und Reste in grün als ausgedehnter Strang oder als helikal. Konservierte Reste sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Konservative Austausche sind mit einem Doppelpunkt gekennzeichnet und halb-konservative Austausche sind mit einem Punkt gekennzeichnet. (C) Struktureigenschaften der Gruppe I der zirkulären Bacteriocine. Lactocyclin Q wurde nach CclA modelliert, wohingegen Circularin A und Uberolysin nach AS-48 modelliert wurden. Das obere Feld stellt die helikale Orientierung der Peptide dar, das untere Feld zeigt die von L, I, V, M, F und W resultierenden hydrophoben Flecken (gelb). Ein schwarzer Pfeil zeigt die Position der N- zu C- Zyklierung an.

1.2.1.2 Gencluster der zirkulären Bacteriocine

Die Gencluster für die Biosynthese der zirkulären Bacteriocine enthalten meist ein Strukturgen für einen Peptid-Präkursor, Gene für die Biosynthese und Reifung, ein oder zwei ABC-Transporter, ein Immunitätsgen sowie Regulationsgene (Abbildung 3).

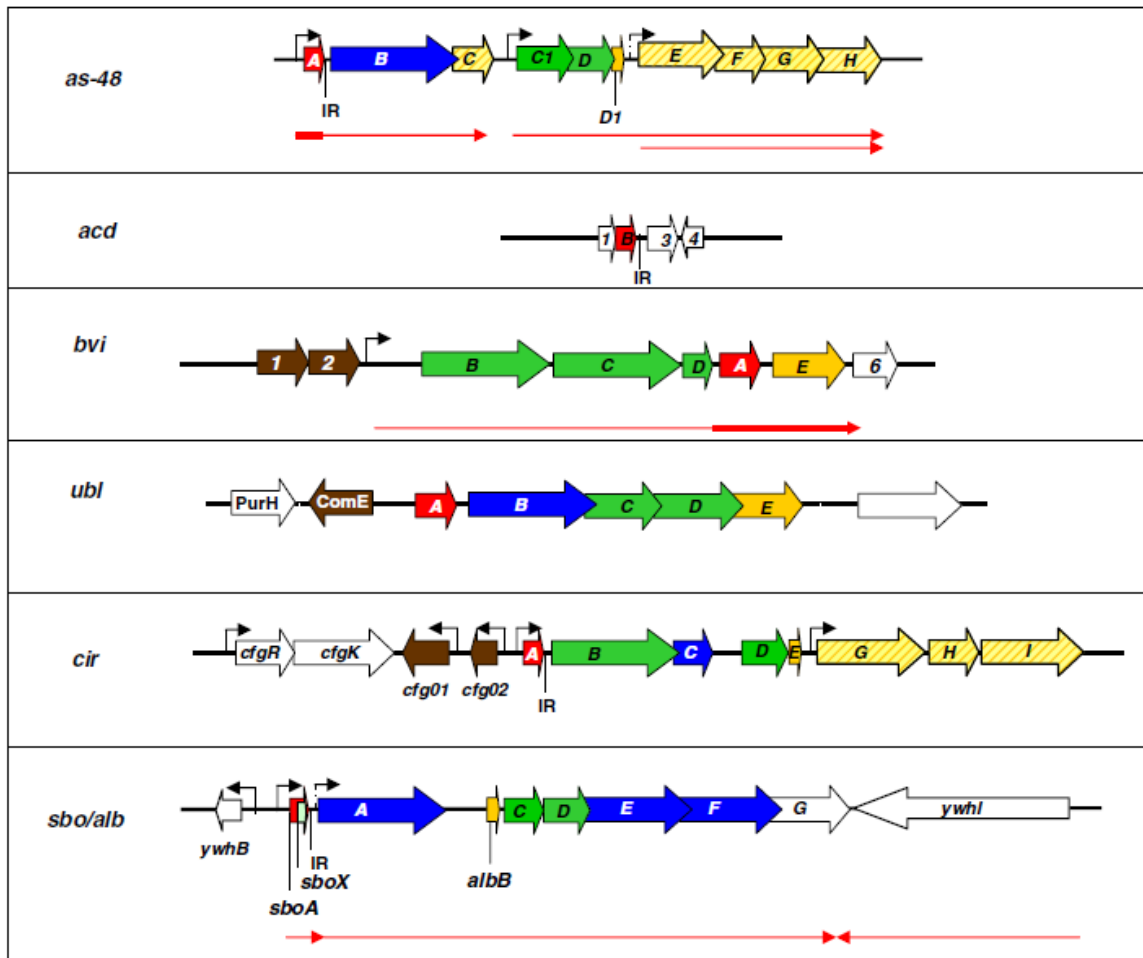


Abbildung 3 aus Maqueda et al. (58) Organisation der in Immunität und Produktion involvierten Gencluster der zirkulären Bacteriocine AS-48 (20, 61), Acidocin B (40), Butyrivibriocin AR10 (38), Uberolysin (95), Circularin A (44) und Subtilosin A (97). Strukturgene, die für die Präbacteriocine kodieren (*as-48A*, *acdB*, *bviA*, *ublA*, *cirA*, *sbiA*) sind in rot gezeigt, putative Biosynthese- und Bearbeitungs-Gene (*as-48B*, *ublB*, *cirB*, *albA*, *albE*, *albF*) in blau und Immunitätsgene (*as-48D1*, *bviE*, *cirE*, *ublE*, *albB*) in gelb. Die ABC-Transporter, die in die Sekretion involviert sind (*as-48C1D*, *ublCD*, *cirBD*, *albCD*), sind in grün abgebildet, wohingegen die in die Immunität involvierten (*as-48EFGH* und *cirGHI*) in gelb-gestreift abgebildet sind. Bekannte Regulationsgene sind in braun dargestellt und weiße Gene haben nicht dazugehörige Aufgaben. Putative Promotoren sind als vertikale Pfeile gezeigt. Rote Pfeile unter einem Gencluster zeigen synthetisierte mRNA an und die relative Transkriptmenge wird anhand der Dicke des Pfeils angezeigt (dickere Linien entsprechen mehr detektierter mRNA in Northern Blottings)

Wenn zwei ABC-Transporter vorhanden sind, ist einer für den Export zuständig und einer für die Immunität (AS-48, Circularin A).

Die Homologie der Immunitätspeptide ist gering, gemeinsam ist ihnen jedoch ihre kleine Größe, die starke Ladung und dass sie membranassoziiert sind (58).

In welcher Art die Immunitätspeptide Immunität bieten, ist noch unbekannt, oft hängt die schützende Funktion von der Coexistenz eines ABC-Transporters ab.

1.2.1.3 Uberolysin

Uberolysin ist neben Nisin U ein weiteres Bacteriocin aus *Streptococcus uberis* 42, der zu den „lactic acid bacteria“ (LAB) gehört (95).

Das 7048 Da große Uberolysin ist im Gegensatz zu anderen zirkulären Bacteriocinen thermolabil und lysiert aktiv wachsende grampositive Bakterien.

Das Biosynthese-Cluster besteht aus sechs Genen: *orf1*, *ublA*, *ublB*, *ublC*, *ublD* und *ublE*, welches von 159 bp direct repeats (DR) umschlossen ist (Tabelle 2 und Abbildung 3).

ORF1 kodiert ein ComE ähnliches Protein, welches als Regulator fungieren könnte.

UblA kodiert den Präkursor, der ein nur sechs Aminosäuren langes Leader-Peptid besitzt.

UblB hat Homologie zu CirB aus *Clostridium beijerinckii* ATCC25752 und könnte für die Zirkularisierung verantwortlich sein.

UblC und *ublD* kodieren wahrscheinlich einen Transporterkomplex. Einen weiteren Transporter wie bei Enterocin AS-48 gibt es nicht.

UblE stellt das eventuelle Immunitätspeptid dar.

Tabelle 2 Charakteristik der vorausgesagten Proteine des *S. uberis* 42 *ubl* Clusters, modifiziert aus Wirawan et al. (95)

ORF	ORF-Größe (bp)	abgeleitetes Protein				
		Größe (kDa)	pI	Homologie (% Ähnlichkeit)	Gleichheit, %	vorgeschlagene Funktion
<i>orf1</i>	756	29.6	9.4	Response Regulator, ComE (41, 64)		Regulation der Bacteriocinproduktion
<i>ublA</i>	231	7.8	8.5	Putatives Peptidantibiotikum (43,60)		Uberolysin Präpeptid
<i>ublB</i>	1608	63.5	9.5	CirB (23,43)		Zirkularisierung des Bacteriocins
<i>ublC</i>	546	21.3	8.7	Integrales Membranprotein, möglicher Zusatzfaktor der Peptidantibiotikasekretion (35, 58)		Zusatzfaktor für den Transport
<i>ublD</i>	657	25.5	4.8	CirD (35, 59)		Transport des Bacteriocins
<i>ublE</i>	267	10.2	9.2	Keine Homologie		Immunitätspeptid

1.3 TOMM Gruppe - Thiazol/Oxazol-modifizierte Microcine

1.3.1 Microcin MccB17

Die Plasmid- bzw. Chromosomen- kodierten hydrophoben Microcine gehören, wie die größeren Colicine der Enterobakterien, zu den Bacteriocinen. Sie zeigen die gleichen typischen Eigenschaften wie die Bacteriocine der grampositiven Bakterien, wie hohe Stabilität und große Aktivität gegen nah verwandte Bakterien in sehr geringer Konzentration (72).

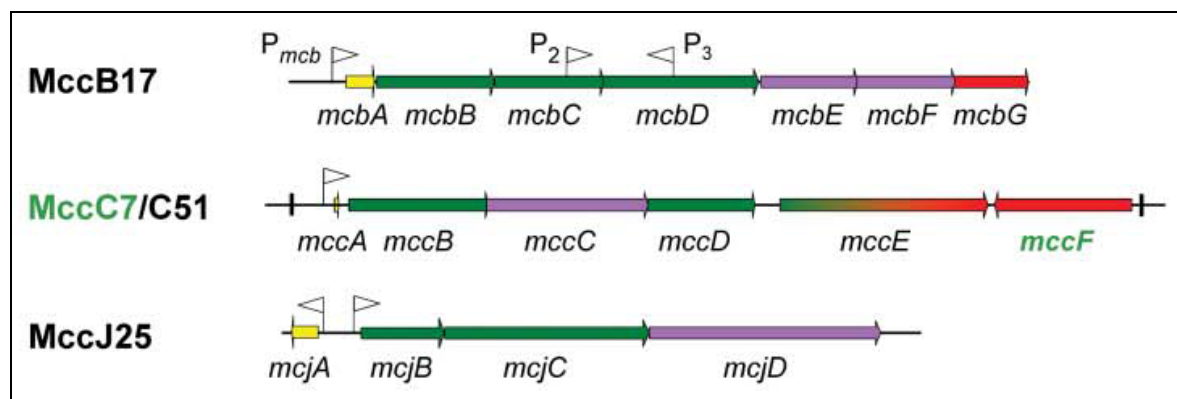


Abbildung 4 Modifiziert aus Duquesne et al. (23). Klasse I Microcine. Gene, die für Immunität und Export benötigt werden, sind in violett abgebildet. Das Gen *mccE*, dessen Produkt in posttranslationale Modifikation (N-terminale Region) und Immunität (C-terminale Region) gegenüber MccC7/C51 involviert ist, ist in grüner zu roter Abstufung abgebildet.

MccB17 gehört zu den Klasse I-Microcinen, die zwischen 1 und 3 kDa groß und sehr stark modifiziert sind. Das MccB17-Gencluster besteht aus sieben Genen (Abbildung 4).

McbA kodiert den 69 Aminosäuren langen Präkursor, wobei das Leader-Peptid 26 Aminosäuren einnimmt. Nach dem Abschneiden des Leaderpeptids beträgt die Masse 3093 Da mit einem sehr hohen Anteil an Glycin (60,5%), Serin (13,9%) und vier Cysteinen (Abbildung 6).

McbB, *mcbC* und *mcbD* kodieren die drei Komponenten der MccB17-Synthetase, die den Präkursor modifiziert und vier Thiazol- und vier Oxazol- Ringe einführt.

McbE und *mcbF* kodieren zwei Proteine, die hauptsächlich in die Sekretion involviert sind. Für die volle Immunität wird zusätzlich das *mcbG* Gen benötigt.

Die *mcb*-Gene liegen wahrscheinlich auf einer Transkriptionseinheit unter der Kontrolle eines Promotors der stationären Phase und zwei zusätzlichen Promotoren innerhalb des Clusters.

McbE, McbF und McbG sind für die Selbst-Immunität nötig, wobei McbE und McbF den Transporter darstellen (Abbildung 5).

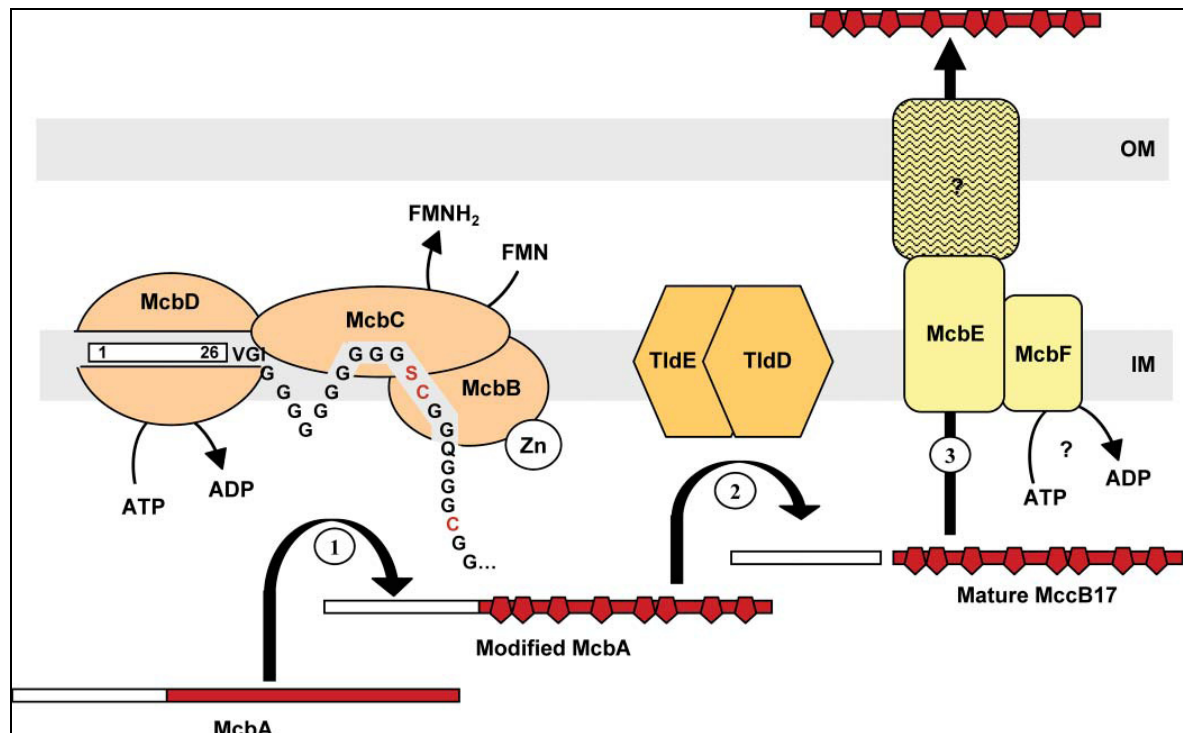


Abbildung 5 Modifiziert aus Duquesne et al. (23) Biosynthese von MccB17. (1) McbA wird durch die MccB17-Synthetase modifiziert, die aus McbB, McbC und McbD besteht. Die ATP-abhängige McbD Untereinheit bindet zuerst das Leader-Peptid, wobei der Polyglycin-Linker die korrekte Positionierung ermöglicht. Die Zink-abhängige Cyclodehydratase McbB-Untereinheit zyklistiert dann Cystein und Serin in den stromaufwärts liegenden Peptid-Carbonylgruppen. Die resultierenden Oxazoline und Thiazoline werden dann durch die Flavon-abhängige McbC-Untereinheit weiter entsättigt. (2) Das Leader-Peptid wird von dem modifizierten McbA durch die chromosomal kodierten TldE- und TldD-Proteine abgespalten. (3) Das reife MccB17 wird durch die Exportmaschinerie sekretiert, die aus McbE/McbF in der inneren Membran (IM) besteht und aus einer unbekannten Komponente der äußeren Membran (OM).

Innerhalb des Dreier-Synthasekomplexes ist das ATP-abhängige McbD für die anfängliche Erkennung und Interaktion mit dem McbA Präkursor verantwortlich, wobei dessen Polyglycin-Linker die korrekte Positionierung ermöglicht. Die Leader-Peptid - Aminosäuren Phe8 und Leu12 sind dabei für die Erkennung wichtig.

Das Zink-abhängige McbB vollführt den ersten Cyclodehydratationsschritt, der zu Oxazolin und Thiazolin Ringen führt (-18 Da), die dann weiter durch die flavinabhängige Dehydrogenase McbC (-2 Da) zu Oxazol- und Thiazol-Ringen oxidiert werden.

Die Ringe werden dabei schrittweise vom N-Terminus in Richtung C-Terminus eingeführt. Verschiedene Microcine der Klasse I benötigen ihr Leader-Peptid nicht für den Export. Es kann von den Modifikationsenzymen als Erkennungsstelle benutzt werden, wie es für Microcin MccB17 berichtet wurde (23). Das Abschneiden des Leader-Peptids wird durch eine chromosomal codierte Protease (TldE/TldD) ausgeführt.

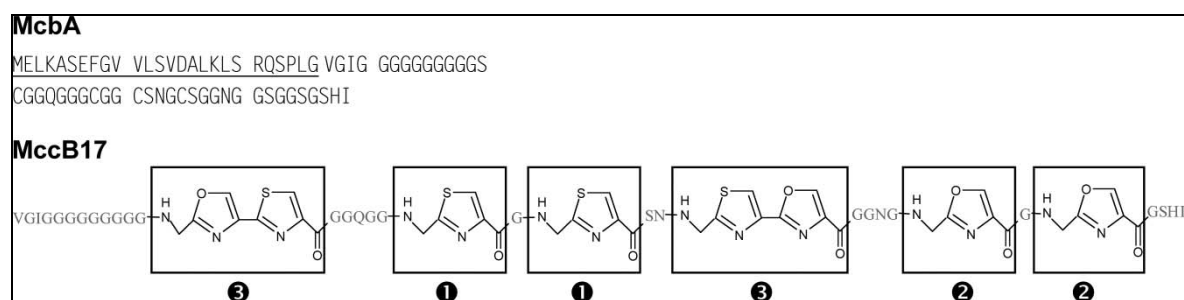


Abbildung 6 Modifiziert aus Duquesne et al. (23). Sequenz des MccB17-Präkursors (McbA) und Struktur des reifen MccB17. Das 26 Aminosäuren lange McbA-Leader-Peptid ist unterstrichen. Die Aminosäuren des reifen MccB17 sind in grau abgebildet. Die MccB17 Thiazole (1), Oxazole (2) und Doppelringe (3) sind eingerahmt.

Die MccB17 Transkription steigert sich, wenn die Zellen die stationäre Phase erreichen. Diese Aktivierung ist abhängig vom OmpR-Transkriptionsfaktor und unabhängig von RpoS, dem RNA-Polymerase Sigma-Faktor S, der die Transkription von verschiedenen stationäre Phase-induzierten Genen kontrolliert. Sigma 70 scheint an dieser erhöhten Produktion beteiligt zu sein.

MccB17 wird im sensitiven Stamm mit Hilfe des OmpF-Porin durch die äußere Membran geschleust. Das innere Membranprotein SbmA ist am weiteren Transport in das Zytoplasma beteiligt, in dem MccB17 das DNA-Supercoiling durch die DNA Gyrase verhindert. Die Bindestelle ist die C-terminale Domäne von GyrB.

1.3.2 TOMM-Cluster

Die dem Microcin MccB17 ähnlichen, Oxazol- und Thiazol- Ringe enthaltenden Peptide scheinen nicht nur auf Enterobakterien beschränkt zu sein, sondern finden sich verbreitet unter Prokaryoten (Abbildungen 7 und 8) (53).

Diese Produkte werden aufgrund ihrer konservierten genetischen und chemischen Struktur zu den Thiazol/Oxazol-modifizierten Microcinen (TOMMs) zusammengefasst (28).

Der Mechanismus der Modifikation wird unter Anderem in den Biosynthesewegen für Streptolysin S (19), Microcin B17 (55), den Patellamiden (79) und den Thiopeptiden (43, 56, 63, 93) verwendet.

Erstaunlich ist, dass einige Cluster in den Genomen von Säuger-Pathogenen gefunden wurden (*Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), ähnliche Cluster aber auch bei Cyanobakterien, Archäen und Pflanzensymbionten wie *Pseudomonas putida*, *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bradyrhizobium japonicum*, so dass die Produkte der TOMM-Cluster eventuell für die Etablierung einer Überlebensnische notwendig sind.

Allen Vertretern dieser modifizierten Microcine ist ein kurzes Cystein/Serin/Threonin-reiches Protoxin und ein Synthetasekomplex aus Cyclodehydratase, „Docking Scaffold“ und Dehydrogenase gemeinsam.

McbB vollführt den ersten Cyclodehydrationssschritt, was zu (Methyl) Oxazolin- (aus Threonin und Serin) und Thiazolin- (aus Cystein) Ringen führt (-18 Da), die dann weiter durch die Dehydrogenase McbC (-2 Da) zu (Methyl) Oxazol- und Thiazol-Ringen modifiziert werden (Abbildung 9).

Weiterhin vorhanden sind Immunitätsgene, modifizierende Enzyme wie Methyltransferasen, Acetyltransferasen und Lantibiotika-Dehydratasen, sowie Regulatoren, Proteasen und ABC-Transporter (Abbildung 7).

Die *sagB*-ähnlichen Cluster von *T. erythraeum* und *P. didemni* besitzen eine Serin-Protease, aber keinen ABC-Transporter, so dass die Protease die Kopf-Schwanz-Verknüpfung katalysieren könnte. Auf diese Weise wird das Volumen des Peptids stark verkleinert. Dies würde einen aufwändigen ABC-Transporter unnötig machen.

Eine spezielle Gruppe der TOMMs stellen die Thiazolyl/Thio-Peptide dar, die die Initiationsreaktionen und Elongationsreaktionen der bakteriellen Proteinsynthese blockieren. Charakteristisch für die Thiopeptide ist ein zentrales Pyridin bzw. (Dehydro) Piperidin (93), für dessen Synthese eine Lantibiotika-Dehydratase essentiell ist.

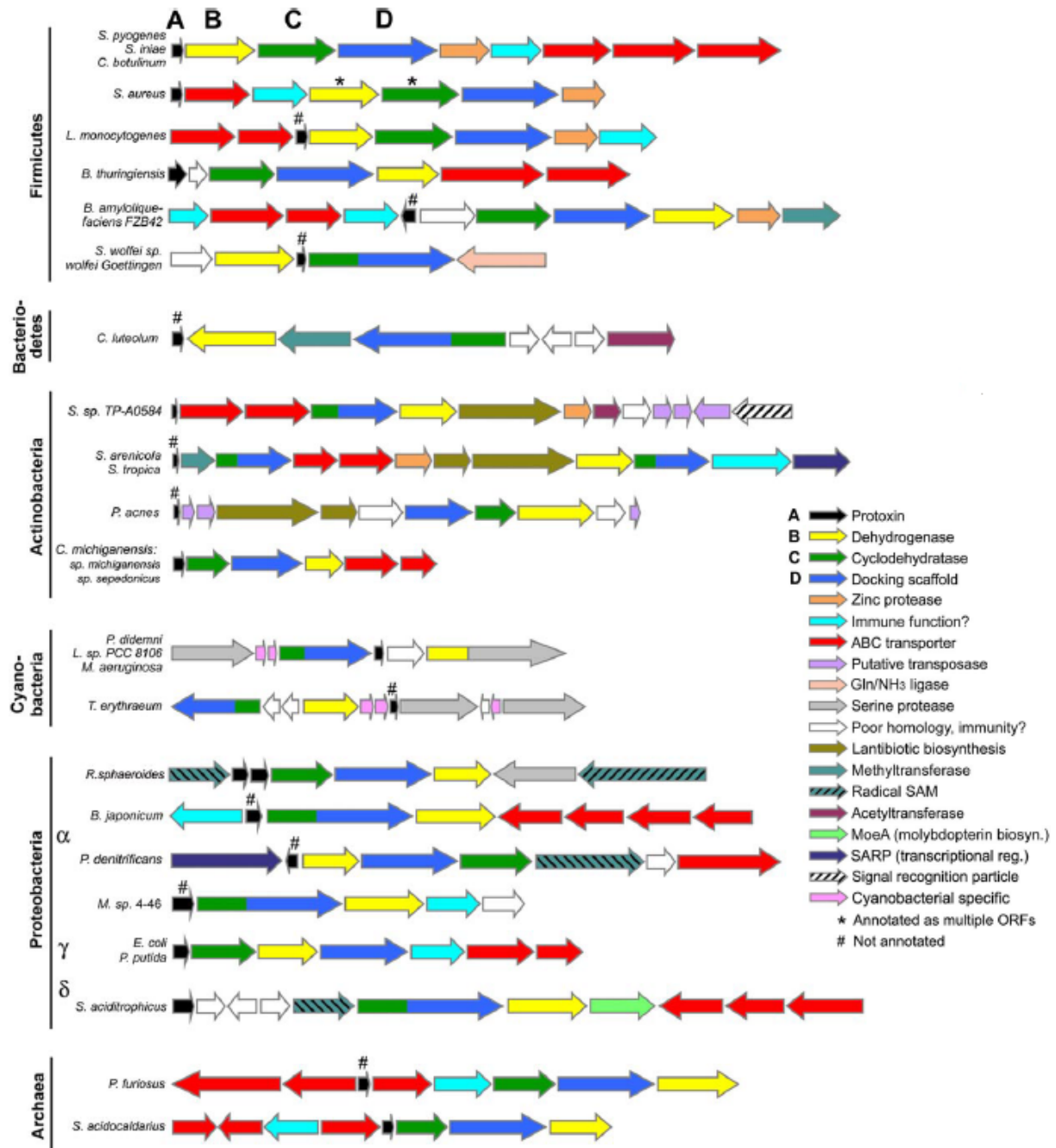


Abbildung 7 Das Biosynthese-Operon für die Produktion von Thiazol/Oxazol-enthaltenden Toxinen ist weit verbreitet. Gencluster von Organismen mit SLS- und MccB17- ähnlichen Bacteriocinen. Die Mitglieder sind nach den prokaryotischen Stämmen sortiert. Relative Genlängen und Richtung sind gezeigt (Skalen für Actinobakterien und Cyanobakterien sind um 50% reduziert.) Jedes Gencluster enthält ein Prototoxin (A, schwarz), eine Dehydrogenase (B, gelb), eine Cyclodehydratase (C, grün), und einen "Docking Scaffold" (D, blau). Diese Gene produzieren Einzeldomän- und Fusions-Proteine. Zahlreiche zusätzliche Enzyme erhöhen die chemische Vielfalt der Toxin-Familie. Modifiziert aus Lee et al. (53)

Organism	Primary Sequence	Designation
<i>S. pyogenes</i>	MLKFTSNILATSV AETTQVAPGG* CCCCCTTC FSIATGSGNSQGGSGSYTPGK	SagA
<i>S. iniae</i>	MLQFTSNILATSV AETTQVAPGG* CCCCCTTC CVAVNVGSGSAQGGSTPAPAPK	
<i>C. botulinum</i>	MLKFNEHVLTTNNNNKVTAPG* SCCCSCCC CVSVSVGGGSASTGGGAAAGQGGN	ClosA
<i>S. aureus</i>	MMKINNHTINGYSDINSSEAMQYAAG* CCSCSCSCSCSCSC CTSA ST AEQ	
<i>L. monocytogenes</i>	MNIKSQSSNGYSNNAVSEAMNYAAG* CCSCSC STCTCTCTC ASS AATKM	
<i>B. thuringiensis</i>	MEQKILDKLTETGKINYAHKPD D *SGCAGCMGCAGGTGCAGTGCIGQG VWKKCS GK	
<i>B. amyloliquefaciens</i>	MEEVTIMTQIKVPTALIASVHGE G *QHLFEPMAAR CTCTTIISS STF	
<i>C. luteolum</i>	MKVSVVEDTAACMHILPVS PD *IEMDGAALNSVAGGG SCCGSS SCWDEAQ	
<i>S. sp. TP-A0584</i>	MENVQTLAIDDIENIDAEVTIEELSSTNGA-AT VTILCS GGT LS SAGCV	
<i>C. michiganensis</i>	MESGAPAPLRTTATEVAPAAGG*DDASDALLAEAF GTIT HRGAEEELVMGDV TLCCSTT SSSSGGGGRQQPR	
<i>P. didemni</i>	MNKNILPQQGPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDAGLEAS-V TACITFC -AYDGVES-IT VCISVC -AYDGE	
<i>L. sp. PCC 8106</i>	MD* ASACMP CYP*SYDGVD* ASVCMP CYP*SYDGVD* ASVCMP CYP*SYDDAE	
<i>T. erythraeum</i>	MGKKNIQPNSSQPVFRSLVARPALEELREENLTTEGNQHGGLANGPGPS-GDGLHPRL CSC -SYDGDDE	
<i>B. japonicum</i>	MADVSLATFHLFDKENVGSRVQLAWR* CGGCRGCRGCRGCR GVGCR CAGCA VG VVGC AV SCAGCC ASWGR CRWC	
<i>E. coli</i> MC4100	MELKASEFGVLSVDALKLSRQSP LG -VGIGGGGGGGGG SC GGQGGG CGGC SNG CS GGNGG SGGS SGSHI	McbA
<i>P. putida</i>	MENQYGISVMELASDTHCDMEAEFFGG- SG SAGG CGSG CGCGGGGG CKGSG SGSGSGGNGINNDP VT L	

Abbildung 8 Ausgewählte Protoxin-Aminosäuresequenzen. Die vorhergesagte Leader-Peptid-Spaltstelle ist mit einem Sternchen markiert. Bindestriche zeigen bekannte Spaltstellen an. Mögliche Orte für eine Heterozyklisierung sind blau markiert und bekannte Zyklisierungen in Rot. Grüner Text kennzeichnet eine Umwandlung zu Dehydroalanin. SagA-ähnliche Toxine (oben) sind vorhergesagte Zytolysine. Modifiziert aus Lee et al. (53)

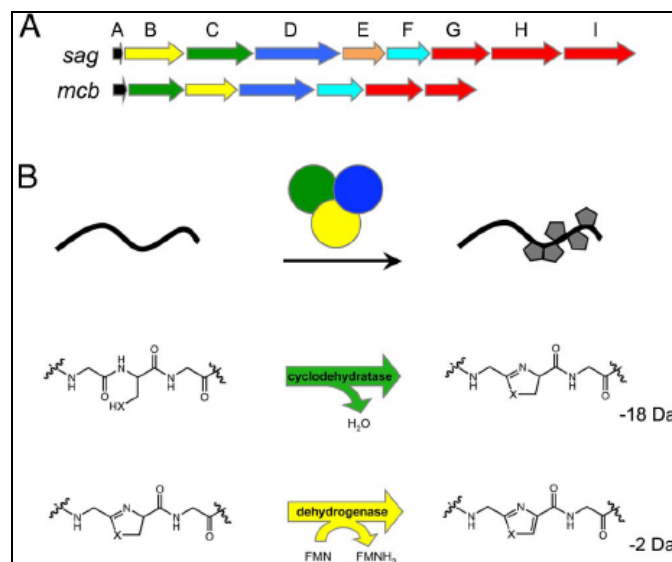


Abbildung 9 Konservierung des Toxin-Biosyntheseoperons in *S. pyogenes* und *E. coli*. Modifiziert aus Lee et al. (53). (A) Genorganisation des Streptolysin S-assoziierten Genclusters (*sagA-I*) von *S. pyogenes* und des *E. coli* Microcin B17-Genclusters (*mcbA-G*). (B) Durch den Drei-Komponenten Synthetasekomplex werden Oxazol- und Thiazol-Ringe in das peptidische Protoxin-Gerüst (schwarz) eingebaut. Es wird die chemische Umwandlung durch SagC/McbB- (grün, Cyclodehydratase) und SagB/McbC- (gelb, Dehydrogenase) Orthologe gezeigt. Die Veränderung der molekularen Masse bei jeder Reaktion ist in Dalton abgebildet. SagD/McbD (blau) dient als enzymatisches Gerüst und ermöglicht die Substratbindung.

1.4 Zielsetzung

Bacillus amyloliquefaciens FZB42 ist für die nicht-ribosomale Synthese von Polyketiden, Lipopeptiden, Siderophoren und dem antibakteriellen Bacilysin bekannt (9).

Aus der Genomsequenzierung gab es keine Hinweise auf genetischer Ebene für ein ribosomal hergestelltes antibakterielles Peptid.

Butcher und Helmann zeigten jedoch in ihrer Veröffentlichung „Identification of *Bacillus subtilis* sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by *Bacilli*.“, dass die *sfp*-Mutante CH3, die alle Polyketide, Lipopeptide und Siderophore nicht mehr herstellen kann, antibakterielle Aktivität gegen *Bacillus subtilis* aufweist (6).

Sie vermuteten als Ursache eine ribosomal hergestellte Substanz, die womöglich Aureocin A53 ähnelt. Dies ist ein lineares Peptid aus *Staphylococcus aureus*, welches kein Leader-Peptid besitzt.

In dieser Arbeit soll nun diese Substanz identifiziert und charakterisiert werden, die gegen *Bacillus subtilis* CU1065 und besonders gegen dessen *sigW*-Mutante, aktiv ist.

2 Material

2.1 Stämme

Tabelle 3 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
FZB42	Wildtyp	FZB Biotech GmbH Berlin
RS6	CH3 <i>bac::cm Δsfp::em</i>	(11)
RS26	RS6 <i>mcbC::spc</i>	diese Arbeit
CH5	FZB42 <i>Δsfp Δycze::cm</i>	(7, 10)
AB10	CH5 mit pMarA Plasmid <i>kan^R em^R</i>	Anto Budiharjo, HU-Berlin
RSpMarA1	AB10 <i>degU::kan</i>	diese Arbeit
RSpMarA2	AB10 <i>degU::kan</i>	diese Arbeit
RS17	RS6 <i>ΔRBAM_029230::spc</i>	diese Arbeit
RS18	RS6 <i>ΔRBAM_029240::spc</i>	diese Arbeit
RS19	RS6 <i>ΔRBAM_029220::spc</i>	diese Arbeit
RS16	RS6 <i>ΔRBAM_029190::spc</i>	diese Arbeit
RS31	RS6 <i>pznC::spc</i>	diese Arbeit
RS32	RS6 <i>pznA::spc</i>	diese Arbeit
RS29	RS6 <i>ΔpznF::spc</i>	diese Arbeit
RS27	RS6 <i>ΔpznI::spc</i>	diese Arbeit
RS28	RS6 <i>ΔpznJ::spc</i>	diese Arbeit
RS33	RS6 <i>ΔpznL::spc</i>	diese Arbeit
WY06	CH5 <i>ΔacnF-acnE::kan</i>	Zhiyuan Wang, Kunming, R.China
WY01	AB10 <i>RBAM_029230::kan</i>	Zhiyuan Wang, Kunming, R.China

Tabelle 4 weitere Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz ^a
<i>E. coli</i> DH5α	supE, hsdR17, recA1, ΔlacU169(Ø80lacZΔM15), gyrA96, thi-1, endA1	(77)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	Wildtyp	ATCC
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC14577	Wildtyp	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	Helmann Lab., USA (6)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Bacillus brevis</i> ATCC8246	Wildtyp	ATCC
<i>Clavibacter michiganensis</i> NCPFB382	Wildtyp	Uni Bielefeld, Prof. Eichenlaub
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC9789	Wildtyp	ATCC
<i>Micrococcus luteus</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Bacillus pumilus</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Paenibacillus validus</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Bacillus subtilis</i> CU1065	<i>B.s.</i> 168 <i>trpC2 attSPβ</i>	Helmann Lab., USA (6)
<i>Bacillus subtilis</i> HB0042	CU1065 <i>sigW::kan</i>	Helmann Lab., USA (6)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Paenibacillus granivorans</i> TSB007	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Bacillus megaterium</i> 7A1	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Arthrobacter</i> spez.	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Staphylococcus aureus</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>E. coli</i> K12	Wildtyp	AG Mikrobiologie, HU
<i>Klebsiella terrigena</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Pseudomonas</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Erwinia caratovora</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Bacillus subtilis</i> HB10102	<i>B. subtilis</i> 168 <i>sigW::mls</i>	Helmann Lab., USA (6)

<i>Bacillus subtilis</i> HB0008	CU1065 <i>fosB::cm</i>	Helmann Lab., USA (6)
<i>Bacillus subtilis</i> HB101031	CU1065 <i>ydbST::kan fosB::cm</i>	Helmann Lab., USA (6)
<i>Bacillus subtilis</i> HB101013	CU1065 <i>ydbST::kan</i>	Helmann Lab., USA (6)

^a ATCC: American Type Culture Collection

2.2 Plasmide

Tabelle 5 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGEM-T	<i>Ap^R</i> , <i>lacZ'</i>	Promega
pRS26A	pGEM-T mit 2700 bp <i>mcbC</i>	diese Arbeit
pRS26B	PGEM-T mit <i>mcbC::spc</i>	diese Arbeit
pMarA	Plasmid mit <i>mariner</i> Transposon TnYLB-1 <i>kan^R em^R</i>	(52)
pRS31a	pGEM-T mit 2600bp <i>pznC</i>	diese Arbeit
pRS31b	PGEM-T mit <i>ΔpznC::spc</i>	diese Arbeit
pRS32a	pGEM-T mit 2200 bp <i>pznA</i>	diese Arbeit
pRS32b	PGEM-T mit <i>pznA::spc</i>	diese Arbeit
pRS29	PGEM-T mit SOE Fusionsprodukt <i>pznF::spc</i>	diese Arbeit
pRS27	PGEM-T mit SOE Fusionsprodukt <i>pznI::spc</i>	diese Arbeit
pRS28	PGEM-T mit SOE Fusionsprodukt <i>pznJ::spc</i>	diese Arbeit
pIC333	Plasmid mit Spectinomycinresistenzkassette	Tarek Msadek, Paris

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 6 verwendete Oligonukleotide

Primername	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
mcbC fw	ATCCATATCGCCAATCATACGG	pRS26A/B
mcbC rv	GGAATCAATACCTGTCAGTTCG	pRS26A/B
Spc fw	CTCAGTGGAACGAAAACACG	Resistenzkassette
Spc rv	TAAGGTGGATACACATCTTGTC	Resistenzkassette
oIPCR1	GCTTGTAATTCTATCATAATTG	inverse PCR Transposon
oIPCR2	AGGGAATCATTTGAAGGTTGG	inverse PCR Transposon
oIPCR3	GCATTTAATACTAGCGACGCC	sequenzieren
YcaO fw	ATTGACTAGGAGGTATTGGACG	pRS31A/B
YcaO rv	TTCTATTGAATAGGAGGAGGCG	pRS31A/B
007400 Cst fw	TGGAATGCTCTTTCCGCAGTAC	pRS32A/B
007400 Cst rv	GTAACCTCTGTTTCCACGTAACC	pRS32A/B

Tabelle 7 Oligonucleotide für SOE PCR

Primername	Sequenz (5' – 3')
029190 fw	GACTTTGAAAATCATTTTCGGGC
029190 rv	GGCAGCATGAAATCATTTGAC
029190 front spc fw	AAGTAAAAGGGGCAGAAATCATATGAGCAATTTGATTA ACGG
029190 front spc rv	CCGTTAATCAAATTGCTCATATGATTTCTGCCCCTTTTA C
029190 back spc fw	CTATAGAAACTTCTCTCAATTAGGCCAGTGCGGCTCTTT ATTTCG
029190 back spc rv	CGAAATAAAGAGCCGCACTGGCCTAATTGAGAGAAGTT TCTATAG
029220 fw	GATGTGCTCTTTGTCAACACG
029220 rv	GGCGCCACTTAATAATAACGC
029220 front spc fw	GCCTCTCTCCCAAATACATATGATGAGCAATTTGATTA ACGG
029220 front spc rv	CCGTTAATCAAATTGCTCATCATATGTATTTGGGAGAG AGGC
029220 back spc fw	CTATAGAAACTTCTCTCAATTAGTGCTTATTCATTCTGC ATCAGG
029220 back spc rv	CCTGATGCAGAATGAATAAGCACTAATTGAGAGAAGTT TCTATAG
029230 fw	TGGAAGTGCATCGGATAGAAGC
029230 rv	CAGCATACTGCCGAAGTTCCTG
029230 front spc fw	GCTCGGGAGAGAGTCAATTAAGCATGAGCAATTTGATT

Material

	AACGG
029230 front spc rv	CCGTTAATCAAATTGCTCATGCTTAATTGACTCTCTCCC GAGC
029230 back spc fw	CTATAGAACTTCTCTCAATTAGGCTGCAAAAAGAGCC TCTCTCC
029230 back spc rv	GGAGAGAGGCTCTTTTTGCAGCCTAATTGAGAGAAGTT TCTATAG
029240 fw	TTTATAGATCATCGGGAAACCCG
029240 rv	CGGAATGCTAACCATACATACG
029240 front spc fw	GTAAGAAAAGGATGATAATATGAGCAATTTGATTAACG GAAAAATACC
029240 front spc rv	GGTATTTTTCCGTTAATCAAATTGCTCATATTATCATCC TTTTCTTAC
029240 back spc fw	CTATAGAACTTCTCTCAATTAGCTCGGGAGAGAGTCA ATTAAGC
029240 back spc rv	GCTTAATTGACTCTCTCCCGAGCTAATTGAGAGAAGTTT CTATAG
Spc in 7410 für 7400 fw	TCTATAGAACTTCTCTCAATTAGAAAAGAAAAGGGCA AGGAAATGAG
7400 rv	TCTTCATCACGCAAATCAGTGC
7400 fw	CCGCATAAACGGGAATTGGAAG
7410 in spc für 7400 rv	ACTCATTTTCCTTGCCCTTTTCTTTTCTAATTGAGAGAAG TTTCTATAG
Start in spc für 7400 fw	CTTTGTAAAAAGAGGAGCCTGTCTTATGAGCAATTTGA TTAACGG
Spc in start für 7400 rv	TTTTTCCGTTAATCAAATTGCTCATAAGACAGGCTCCTC TTTTTACAAAG
7430 in spc für 7440 fw	GCTGGGACTAAAAGGAGAGCGGGAAATGAGCAATTTG ATTAACGG
Spc in ORF2 für 7440 fw	TTCTATAGAACTTCTCTCAATTAGATTAAATATAAAGA AGCATAGACC
Spc in 7430 für 7440 rv	TTTTTCCGTTAATCAAATTGCTCATTTCCCGCTCTCCTTT TAGTCCCAGC
ORF2 in spc für 7440 rv	TGGTCTATGCTTCTTTATATTAAATCTAATTGAGAGAAG TTTCTATAG
7440 rv	TCACGTCCAATACCTCCTAGTC
7440 fw	ATCGACAGAGGGCAGATTATCG
ORF2 in spc für 7450 fw	GATTATTGACTAGGAGGTATTGGACATGAGCAATTTGA TTAACGG
7460 in spc für 7450 rv	GTTTGTGAGACATCTGTATTCCTCCCTAATTGAGAGAA GTTTCTATAG
7450 rv	TAATGTCGTCCATTTACTCACC
7450 fw	TTGGCTCGAATAAATGTTGACC
Spc in ORF2 für 7450 rv	TTTTTCCGTTAATCAAATTGCTCATGTCCAATACCTCCT AGTCAATAATC
Spc in 7460 für 7450 fw	TTCTATAGAACTTCTCTCAATTAGGGAGGAATACAGA TGTCTCAACAAAC
Ende in spc für 7500 rv	CGCTTAGACCCTAAAGATATACTTTCTCTAATTGAGAG AAGTTTCTATAG
7490 in spc für 7500	AACTCTTTGGAGGTGTCACAGTTATATGAGCAATTTGA

Material

fw	TTAACGG
7500 fw	AAGGTCCTAGACGCCCTATTCC
7500 rv	GATGTGTAGTTTTCAACGCTCG
Spc in ende für 7500 fw	CTATAGAAACTTCTCTCAATTAGAGAAAGTATATCTTTA
Spc in 7490 für 7500 rv	GGGTCTAAGCG
	CCGTTAATCAAATTGCTCATATAACTGTGACACCTCCA
	AAGAGTTTACC

2.4 Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
Roth, Karlsruhe	APS, Agarose, Ammoniumsulfat, Ampicillin, Chloroform, EDTA, Ethanol, Glycerin, Glutaminsäure, Hefeextrakt, IPTG, Kanamycin, Methanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Salzsäure, TEMED, TRIS, Trypton, X-Gal, Rotiphoreseigel 29:1 Acrylamid / Bisacrylamid 40%, Phenol, Harnstoff, Dithiothreitol (DTT), Glycin, Glycerin, Essigsäure, Schiff's Reagenz für Aldehyde, Acetonitril, Ameisensäure, Dialysemembran „Zellutrans“, Tricine, Natriummetabisulfit, Perjodsäure, Tryptophan, Pepton, SDS, Manganchlorid
SERVA, Heidelberg	Agar-Agar, Chloramphenicol, α -D-Glucose, Lincomycin/HCl, Magnesiumchlorid, 30% N-Laurylsakrosin-Lösung, Cobaltchlorid
Sigma Aldrich	Ethidiumbromid, EZBlue, Ultra Low range protein marker, Spectinomycin
Oxoid, Hampshire	Blutagarplatten, Casein Hydrolysat
Fermentas	alle Restriktionsenzyme, Lambda DNA/ EcoRI+HindIII Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder dNTP-Mix
Fluka	Erythromycin, Dextrin-10, Sojapepton, Chloramphenicol
Merck	Isopropanol, β -Mercaptoethanol, Magnesiumsulfat

2.5 Antibiotika

Tabelle 8 Antibiotika

	Stock	Endkonzentration <i>E. coli</i>	Endkonzentration <i>Bacillus</i>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	-
Lincomycin	25 mg/ml	-	25 µg/ml
Chloramphenicol	10mg/ml	7 µg/ml	7 µg/ml
Erythromycin	5 mg/ml	-	1 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	7 µg/ml	7 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml	100 µg /ml	80 µg /ml

2.6 Enzyme

In dieser Arbeit wurden die nachfolgend aufgeführten Enzyme verwendet. Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben in den empfohlenen Puffern verwendet.

Tabelle 9 Verwendete Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
FastAP	1 U/µl	Fermentas
Klenow-Fragment Exo ⁻ (<i>E. coli</i> Pol.I, large fragment)	5 U/µl	USB
Lysozym	10 mg/ml	Sigma
RNase in TE	100 mg/ml	Roth
<i>Taq</i> -Polymerase	10 U/µl	Appligene
<i>Pfu</i> -Polymerase	2,5 U/µl	Fermentas
<i>T4</i> -Ligase	5 U/µl	Fermentas
Proteinase K in TE	20 mg/ml	
Restriktionsenzyme	verschieden	Fermentas
<i>T4</i> -Polynukleotidkinase (PNK)	10 U/µl	Fermentas

2.7 Kits

Tabelle 10 kommerzielle Kits

Name	Hersteller
pGEM-T	Promega
Nucleospin Extract	Machery-Nagel
Nucleospin Plasmid	Machery-Nagel
Rapid Ligation	Fermentas

2.8 Kulturmedien

Die Medien für die Zellanzucht wurden zur Sterilisation 20 min bei 121°C autoklaviert, sofern nicht anders angegeben. Für Platten wurden 15 g/l und für Top-Agar 7 g/l Agar hinzugefügt. Nach Abkühlen auf 60°C wurden Zusätze nach Bedarf hinzugefügt.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H₂O dest.

Blau-Weiß-Selektionsplatten (pGEM-T-Vektoren) wurden zusätzlich 100 µg/ml Amp, 32 µg/ml X-Gal und 200 µM IPTG zugesetzt.

Diabrot-Medium (57): 40 g Sojapepton, 40 g Dextrin 10, 1,8 g KH₂PO₄, 4,5 g K₂HPO₄, 0,3 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,2 ml KellyT Spurenelementlösung, ad 1 l H₂O dest.

Das Medium wurde bei 115°C 10 min autoklaviert und anschließend die sterilfiltrierte Spurenelementlösung zugegeben.

KellyT Spurenelementlösung: 25 mg EDTA Dinatrium Dihydrat, 0,5 g ZnSO₄ x 7 H₂O, 3,67 g CaCl₂ x 2 H₂O, 1,25 g MnCl₂ x 4 H₂O, 0,25 g CoCl₂ x 6 H₂O, 0,25 g Ammoniummolybdat, 2,5 g FeSO₄ x 7 H₂O, 0,1 g CuSO₄ x 5 H₂O. Der pH-Wert wurde auf 6 mit NaOH eingestellt, auf 500 ml mit H₂O dest. aufgefüllt und bei 4°C dunkel gelagert.

MD-Medium (48): 0,89 ml 10 x PC Puffer, 1 ml Glucose 20%, 0,1 ml L-Trp (5 mg/ml), 27,5 µl FeCl₃/ Na-Citrat (4 mg/ml), 30 µl MgSO₄ (1 M), 7,95 ml H₂O dest.

MDCH-Medium (48): 0,89 ml 10 x PC Puffer, 1 ml Glucose 20 %, 0,1 ml L-Trp (5 mg/ml), 27,5 µl FeCl₃/ Na-Citrat (4 mg/ml), 0,5 ml Na-Glutamat (50 mg/ml), 30 µl MgSO₄ (1 M), 0,2 ml Casein Hydrolysate (5 %), 7,25 ml H₂O dest.

Minimalagar (16)

10 x TSS Salze: 20 g (NH₄)₂SO₄, 3,5 g K₂HPO₄ x 3 H₂O, 60 g TRIS, pH 7,5, ad 1 l H₂O

Wasseragar: 15 g Agar in 870 ml H₂O dest. wurden unter Kochen und Rühren gelöst, zu 170 ml portioniert und autoklaviert.

TSSA (Tris Spizizen salts minimal agar): zu 170 ml verflüssigtem Wasseragar werden steril folgende Lösungen zugegeben: 20 ml 10 x TSS Salze (60°C), 5 ml 20 % Glucose, 2 ml 0,1 M MgSO₄ x 7 H₂O, 2 ml 0,4 % FeCl₃/ 0,4% Trinatriumcitrat x 2 H₂O

Bennet Medium (für Streptomyces, (37)): 0,1 % Hefe Extrakt, 0,1 % Fleischextrakt, 0,2 % Casamino acids, 1 % Glucose

2.9 Puffer, Gele und Lösungen

2.9.1 Für die Zellbiologie

10 x PC (Phosphat-Citrat Puffer): 140,16 g K₂HPO₄ · 3 H₂O, 60 g H₂KPO₄, 8,45 g Tri-Natriumcitrat x 2 H₂O, ad 1 l H₂O dest, pH 7

Transformationspuffer: 8,6 ml H₂O dest., 1 ml 10 x SMM-Salze, 50 µl EGTA (0,2 M), 0,25 ml Glucose (20 %), 0,1 ml MgCl₂ (2 M)

Resuspensionspuffer: 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 10m M EDTA

Lysispuffer: 20 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 4 mg/ml Lysozym (frisch zugeben)

10 x SMM-Salze: 20 g (NH₄)₂SO₄, 140 g K₂HPO₄, 60 g KH₂PO₄, 10 g Tri-Natriumcitrat x 2 H₂O, ad 1 l H₂O dest.

2.9.2 Für molekularbiologische Methoden

TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 7,9, 50 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 250 µg/l Ethidiumbromid

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA (pH 8)

DNA-Ladepuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 15 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau

DNA-Agarosegel: 0,8 % Agarose in TAE-Puffer

2.9.3 Für die Protein-Gelelektrophorese

Fixierlösung: 100 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, 500 ml H₂O dest.

5 X SDS-Probepuffer : 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS, 1,4 M β- Mercaptoethanol, 0,1 v% Bromphenolblau

Coomassie Färbelösung : 0,2 % Coomassie R250, 0,05 % Coomassie G250, 42,5 % EtOH, 10 % Eisessig, 5 % MeOH

2.9.3.1 SDS Page nach Laemmli (50)

4 % Sammelgel: 0,5 ml Rotiphorese Gel 40 (29:1), 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 50 µl 10 % SDS, 25 µl 10 % APS, 6 µl TEMED, 5,52 ml H₂O dest.

20 % Trenngel: 6 ml Rotiphorese Gel 40 (29:1), 3,28 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 130 µl 10 % SDS, 66 µl 10% APS, 5 µl TEMED, 3,2 ml H₂O dest.

SDS Page Laufpuffer: 25 mM Tris HCl pH 8,3, 0,1 % SDS, 192 mM Glycin, pH 8,8

2.9.3.2 SDS Page nach Schagger und von Jagow (78)

4 % Sammelgel: 0,5 ml Rotiphorese Gel 40 (29:1), 1,55 ml Gelpuffer, 4,2 ml H₂O dest., 75 µl 10 % APS, 5 µl TEMED

16 % Trenngel: 6 ml Rotiphorese Gel 40 (29:1), 5 ml Gelpuffer, 75 µl 10 % APS, 5 µl TEMED, 3,9 ml H₂O dest.

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1 % SDS pH 8,25

Anodenpuffer: 0,2 M Tris-HCl pH 8,9

Gelpuffer: 3 M Tris-HCl pH 8,45, 0,3 % SDS

2.10 Software

„Chromas 1.55"	(Technelysium)
“Corel Draw 10.410"	(Corel Corporation)
“Corel Photo-Paint 10.410"	(Corel Corporation)
“DS Gene 1.5"	(Accelrys Inc.)
“Excel 2000 9.0"	(Microsoft)
“Gene Snap 4.01.00"	(Syngene)
“Gene Tools"	(Syngene)
“Paint Shop Pro 5.01"	(Jasc Software, Inc.)
“Word 2000 9.0"	(Microsoft)
“EndNote"	(Thomson)
“ClustalW"	(87)
“Blast"	(1)
“JPRED"	(14)
“OCTOPUS"	(92)
“DBTBS"	(83)

2.11 Apparaturen

Dampfsterilisator "Varioklav"	(H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim)
Eismaschine	(Ziegra Eismaschinen, Isernhagen)
pH-Meter "761 Calimatic"	(Knick, Berlin)
Pipetten	(Eppendorf)
Präzisionswaage "MC1 Analytic AC 210P"	(Sartorius, Göttingen)
Präzisionswaage "PT3100"	(Sartorius, Göttingen)
Reinstwasseranlage "TKA Genpure"	(TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert)
Stromquelle "Power Pack 25"	(Biometra, Göttingen)
Thermocycler "GeneAmp® PCR System 2700"	(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Thermocycler "PTC100TM"	(MJ Research Inc)
Trockenschrank	(Heraeus)
Vakuumpumpe "260 BR"	(Biorad, München)
"Vortex-VF2"	(Janke &Kunkel, IKA Labortechnik)
Wasserbad "Typ 1008"	(GFL)
Zentrifuge "Sorvall RC5B"	(Du Pont/ Sorvall Instruments, Wilmington)
Rotoren "GS3" und "SS34"	(Hettich)
Kühlzentrifuge "Micro 200R"	(Hettich)
Tischzentrifuge "Micro 200"	(Hettich)
Agarosegelelektrophoresekammern	(Biorad, München)
Brutschränke	(Qiagen, Hilden)
Heizblock „DB 2P“	(Techne, Cambridge, UK)
Peltier Thermal Cycler "PTC-200"	(Biozym, Hamburg)
Schüttelinkubator	(Kühner, Basel, Schweiz)
-80°C Gefriertruhe GFL	(Gebäude+Betriebstechnik GmbH, Berlin)
Fotoanlage „Gene Genius Bio Imaging Systems“	(Syngene, Cambridge, UK)
Sterilbox „BDK UVF 6.12S“	(Reinstraum Mechanik GmbH, Sonnenbühl)

“Protean 3 Minicell” SDS Page Kammern	(Biorad)
Stromquelle “GIBCO BRL PS304”	(Life Technologies)
Waage “PT2100”	(Sartorius, Göttingen)
180°C Schrank “Kelvitron t”	(Hereaus)
Photometer “Ultrospec 3100 pro”	(Amersham Bioscience)
Schüttler für SDS Gele “KL-2”	(Edmund Bühler)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultur von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte bei 28-37°C in LB Medium oder Bennett Medium (*Streptomyces*) auf Agarplatten oder in Flüssigkultur und anschließender Lagerung bei 4°C (*Bacillus* RT). Von rekombinanten Stämmen wurden Stammkonserven (1 ml ÜN Kultur + 300 µl steriles Glycerin) angelegt und bei -80°C gelagert.

3.1.2 Transformation in CaCl₂ kompetente *E.coli* DH5α

Für die Transformation in *E.coli* wurde die Methode von Sambrook (77) angewendet.

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen (200 µl) wurden auf Eis aufgetaut. 50-100 ng DNA (5-10 µl des Ligationsansatzes) wurden steril zu den kompetenten Zellen gegeben und der Ansatz 45 min auf Eis gelagert.

Es folgten 90 s Hitzeschock bei 42°C zur Aufnahme des Plasmids und 2 min Lagerung auf Eis. Danach wurden 900 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37°C bei 200 rpm geschüttelt. 200–400 µl des Ansatzes wurden anschließend auf selektive Antibiotika-Platten ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert.

Bei einer Transformation von pGEM-T in DH5α wurde eine Blau-Weiß-Selektion auf AIX-Platten durchgeführt. Bei Insertion eines Fragmentes in den PGEM-T Vektor wird das lacZ-Gen für die β-Galactosidase unterbrochen und die Kolonien sind weiß.

3.1.3 Herstellung kompetenter *Bacillus amyloliquefaciens* Zellen

Für die Herstellung von kompetenten Zellen wurde eine modifizierte Version des Protokolls von Kunst und Rapoport angewendet (48).

Der zu transformierende Stamm wurde aus der -80°C-Stammhaltung auf eine LB-Platte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 ml LB Medium

mit einem Zahnstocher von dieser Platte angeimpft und bei 37 °C und 210 rpm ~ 4,5 h geschüttelt. 10 ml MDCH Medium (37°C) wurden mit 1 ml der Vorkultur angeimpft ($OD_{600} \sim 0,3$) und bei 37°C und 210 rpm bis zu einer OD_{600} von 1,2-1,3 geschüttelt.

Anschließend wurden 10 ml MD Medium (37°C) hinzugegeben und 1 h bei 37°C und 210 rpm weiter geschüttelt.

Die Kultur wurde anschließend in 2 ml-Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei 6000 rpm bei RT 2 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl des Überstandes resuspendiert.

3.1.4 Transformation von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42

Für die Transformation von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 wurde eine modifizierte Version des Protokolls von Kunst und Rapoport angewendet (48).

In einem 25 ml Röhrchen wurden 100 µl kompetente Zellen vorsichtig 5 min mit 10 µl linearisierter Plasmid DNA bzw. chromosomaler DNA gemixt.

1 ml frischer (37°C) Transformationspuffer wurde hinzugefügt und anschließend bei 37°C unter gelegentlichem Mixen 20 min inkubiert. Es wurde nun 0,5 ml warmes LB-Medium mit 1/100 stel der Standardantibiotikakonzentration hinzugefügt und bei 210 rpm bei 37°C 90 min geschüttelt. 300 µl des Ansatzes wurden auf LB Platten mit normaler Antibiotikakonzentration ausplattiert und bei 37°C ÜN inkubiert.

3.1.5 Oberflächenextraktion von Plantazolicin

3.1.5.1 Präparative Extraktion

Die Stämme wurden auf Platten mit Diabrot- Agar ausgestrichen und bei 37°C 24 h inkubiert. Die Zellen wurden von der Platte abgenommen und mit 1/10 tel Volumen des Agars mit 70% Acetonitril : 30% 0,1 % ige Ameisensäure eine Stunde extrahiert, durch einen 0,45 µm Filter gefiltert und zu 2 ml durch einen Rotationsverdampfer bei 30°C konzentriert. Dieser Extrakt wurde ÜN gegen 5 l H₂O dest. mit einer 1 kDa Membran dialysiert (81).

3.1.5.2 Analytische Extraktion

Die Stämme wurden auf einer Platte mit Diabrot- Agar ausgestrichen und bei 37°C 24 h inkubiert. Anschließend wurde ein Quadratzentimeter der gewachsenen Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und in 50µl 70% Acetonitril : 30% 0,1% ige Ameisensäure überführt und 30s gevortext. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit HPLC-ESI-MS vermessen.

3.1.6 Amylocyclicin A Gewinnung

50 ml Diabrot-Medium wurden in einem 500 ml Glaskolben mit 500 µl einer 10 ml LB ÜN Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis kurz vor Ende der log Phase geschüttelt (6,5 h, OD~8). Die Kultur wurde anschließend in Sorvall Bechern bei 6000 rpm (15 min 22°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 80% Ammoniumsulfatsättigung gefällt. Anschließend wurde 30 min bei 7000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl Methanol versetzt. Der Niederschlag wurde 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Methanolextrakt weiterverwendet (81).

3.1.7 Aktivitätstests

3.1.7.1 Indikatorstammlatten

40 ml handwarmer LB-Agar wurden mit 1 ml Indikatorbakterienkultur ($OD_{600} \sim 1$) gemischt und in eine sterile Petrischale gefüllt. Die Inkubation der Testplatte erfolgte bei RT ÜN.

3.1.7.2 Agar-Diffusionstest/ Bioassay

Mit einem Korkbohrer wurde ein Loch in eine Indikatorstammlatte gestochen und das kreisrunde Stück mit der Impföse entfernt.

1-50 µl Kulturüberstand bzw. dialysierter Zelloberflächenextrakt wurden in das Loch gegeben. Bei einem Volumen von weniger als 20 µl wurde auf 20 µl mit H₂O dest. aufgefüllt.

Alternativ wurde der Extrakt auf einem Antibiotikatestplättchen getrocknet und auf die Indikatorstammplatte aufgelegt oder 10µl der zu testenden Flüssigkeit aufgetropft.

SDS-Gele wurden wie unter „SDS-Page“ angegeben gewaschen und mit dem Indikatorbakterien enthaltenen Agar (siehe „Indikatorstammplatten“) überschichtet.

3.1.7.3 Spot-on-lawn Assay

Modifiziert nach dem Protokoll von Butcher und Helmann (6).

Eine Indikatorstammplatte wurde wie unter 3.1.7.1 beschrieben hergestellt. Die auf antibakterielle Aktivität zu untersuchenden Bakterien wurden in flüssigem LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 4 geschüttelt. 10 µl dieser Kultur wurden auf die Indikatorstammagarplatte aufgetropft und die Platte bei Raumtemperatur ÜN inkubiert.

3.1.8 Herstellung von Transposonmutanten

Nach Le Breton et al. (52). Der das *mariner* Plasmid enthaltene Stamm AB10 wurde über Nacht bei 37°C und 210 rpm geschüttelt und anschließend mit steriler Saline 1:1000 verdünnt, davon 100 µl ausplattiert, 24 h bei 48°C inkubiert und die entstanden Kolonien anschließend im Transposonmutantenscreening getestet.

3.1.9 Transposonmutantenscreening

Die Transposonmutanten wurden parallel jeweils auf eine Kanamycin-Platte und eine Diabrot-Platte überführt.

Die 10 x 10 cm große Platte mit Diabrot-Agar wurde zuvor mit 5 ml handwarmen LB Top Agar überschichtet, der 1:40 mit einer *Bacillus subtilis* HB0042 (OD ~ 1) Kultur vermischt wurde.

Die Kanamycin-Platten wurden ÜN bei 37°C inkubiert, die Diabrot-Platten bei RT.

Am nächsten Tag wurden die auf den Diabrot-Platten gewachsenen Klone bezüglich eines Aktivitätsverlustes gegenüber *Bacillus subtilis* untersucht.

Klone mit verminderter bzw. ohne Aktivität wurden von der parallel angefertigten Kanamycin-Platte selektiert und sequenziert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Chromosomale DNA aus Bakterien wurde in TE-Puffer bei 4°C, Plasmid-DNA in H₂O bidest bei -20°C gelagert.

3.2.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion erfolgte mit Restriktionsenzymen von Fermentas nach Herstellerangaben. Um den Fortschritt der Restriktion zu untersuchen, wurde ein Teil des Restriktionsansatzes in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.2.2 Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

3.2.2.1 Standard PCR

100 ng (Plasmid) - 500 ng (chromosomale) DNA

1 µl 20 mM Vorwärtsprimer

1 µl 20 mM Rückwärtsprimer

5 µl 10 x Puffer für Polymerase

5 µl 2 mM dNTPs

ad 49 µl H₂O dest.

1 µl Polymerase

Der Ansatz wurde in 200 µl Dünnschichtgefäßen zusammenpipettiert.

Bei 94°C wird die DNA aufgeschmolzen. An die einzelsträngige DNA können sich bei Temperaturen um 50-65°C die Primer anlagern. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach dem GC Gehalt der Primer und deren Länge: 4°C für jedes G oder C und 2°C für

jedes A oder T. Die optimalen Annealing-Temperaturen für ein Primerpaar wurden mit Hilfe des „DS Gene“-Programmes berechnet.

Tabelle 11 Allgemeines PCR-Programm

1.	94°C	3 min	25 Zyklen
2.	94°C	0,5 min	
3.	55-65°C	0,5 min	
4.	72°C	1-8 min	
5.	72°C	15 min	
6.	4°C	∞	

Bei 72°C wurde die DNA an den 3'-Enden der Primer durch die Polymerase verlängert. Die Zeitdauer richtet sich nach der Fragmentlänge und der Polymerase: *Taq*: 1 kb / min und für *Pfu*: 1 kb / 2 min. Die Schritte 2 bis 4 erfolgen 25 bis 35 Mal. Je mehr Zyklen durchgeführt werden, desto mehr Produkt erhält man, aber desto höher ist auch die Fehlerrate.

3.2.2.2 SOE-PCR

Nach Horton et al. (32). Um gezielt Sequenzen im Genom unabhängig von Restriktionsschnittstellen durch Resistenzgene zu ersetzen und um polare Effekte zu verhindern, wurden die flankierenden Bereiche aus dem Genom mit überlappenden Primern mit einem Spectinomycinresistenzgen fusioniert.

Die zwei flankierenden Bereiche und die Resistenzkassette wurden in einer ersten PCR mit den überlappenden Primern einzeln amplifiziert, aus einem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Gleiche Mengen der Fragmente wurden in einer zweiten PCR eingesetzt, als Primer dienten dabei der Vorwärtsprimer des vorderen flankierenden Bereichs und der Rückwärtsprimer des hinteren flankierenden Bereichs.

Mit den überlappenden Sequenzen lagern sich die DNA-Stücke aneinander und die Einzelstränge werden durch die Polymerase zu Doppelsträngen aufgefüllt. Mit den Primern ist dann eine Amplifikation des SOE-Fusionsproduktes möglich.

Die Bande des SOE-Fusionsproduktes wurde aus einem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die DNA kann direkt zur Transformation eingesetzt werden, oder es erfolgte eine Polyadenylierung der Enden durch *Taq*-Polymerase und eine anschließende Transformation in den pGEM-T Vektor.

3.2.2.3 Kolonie-PCR

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde etwas Material von frischen Kolonien in den PCR-Ansatz überführt und dann eine Standard-PCR durchgeführt. Der erste 94°C-Schritt wurde von 4 min auf 10 min verlängert, um das Zerstören der Zellen zu verbessern. Um die Effektivität zu erhöhen, kann eine Kolonie in 15 µl H₂O 10 min bei 99°C erhitzt werden. Nach Abzentrifugieren wurden 5 µl des Überstandes für die PCR eingesetzt.

3.2.3 Dephosphorilieren von DNA

Um eine Selbstligation von Plasmiden nach einer Restriktion, in die ein Insert ligiert werden soll, zu verhindern, wurde der Vektor mit FastAP nach Herstellervorgaben dephosphoriliert.

3.2.4 Polyadenylierung von DNA-Enden durch *Taq*-Polymerase

1-7 µl PCR Produkt aus der Gelreinigung

1 µl 10 x *Taq* Puffer

5 Units *Taq* DNA Polymerase

ad 10 µl H₂O dest.

30 min Inkubation bei 70°C

3.2.5 Phosphorilieren von DNA

Um PCR-Produkte in dephosphorilierte Vektoren legieren zu können, wurde das aufgereinigte PCR-Produkt mit PNK nach Herstellervorgaben phosphoriliert.

3.2.6 Ligation

Vektor 50-100 ng

2 µl 10 x Ligase-Puffer

0,5 U Ligase

ad 20 µl H₂O dest.

Die Menge des Inserts wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Insert = 50ng \times \frac{Insertgröße(bp)}{Vektorgröße(bp)} \times Faktor$$

Faktor = 3 für „sticky ends“; Faktor = 1 für „blunt ends“

Der Ansatz wurde zusammenpipettiert und bei 4°C ÜN inkubiert. Alternativ wurde das Rapid Ligation Kit von Fermentas verwendet.

Für die Ligation in pGEM-T wurde das pGEM-T Kit von Promega genutzt. Um PCR Produkte, die durch die *Pfu*-Polymerase synthetisiert wurden, in pGEM-T zu ligieren, wurden Poly-A Enden mit der *Taq* Polymerase eingefügt.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle von PCRs, Restriktionen und zur Reinigung wurden 1-50 µl DNA mit 1/6 tel Volumen Ladepuffer in einem 0,8 % igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden 6 µl *EcoRI-HindIII* geschnittener Lambda DNA-Standard aufgetragen.

Die Gelelektrophorese lief in einer mit TAE Puffer gefüllten Kammer bei 80-120 V.

Die DNA wurde unter dem UV-Licht des Fotogerätes durch Ethidiumbromid sichtbar. Für Kontrollgele wurden 100-120 V verwendet, für präparative Gele 80 V.

Um mit spezifischen PCR-Produkten weiterzuarbeiten, wurden die im Gel sichtbaren Banden dieser PCR-Produkte unter schwachem UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract Kit von Machery Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.8 Plasmidextraktion

Puffer 1: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA

Puffer 2: 200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer 3: 3 M Natriumacetat pH 5,0

Die Extraktion erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (3).

Von einer 5 ml ÜN-Kultur wurden 1,5 ml 5 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet durch starkes Vortexen in 100 µl P1 (Resuspendierungspuffer) resuspendiert. 200 µl P2 (Lysispuffer) wurden hinzugegeben und das Eppendorfgefäß leicht geschwenkt, bis die Flüssigkeit klar wurde. Es wurden 150 µl P3 hinzugefügt, geschwenkt, und der Ansatz 10 min auf Eis gelagert. Bei 13000 rpm wurde 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mit dem dreifachen Volumen 96% igem EtOH bei –20°C 15 min gefällt und anschließend 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen und ohne zu vortexen bei 13000 rpm 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei RT getrocknet, in 50 µl H₂O dest. aufgenommen und bei –20 °C gelagert. Alternativ wurde die Plasmid-DNA mit dem Nucleo Spin Plasmid Kit von Machery Nagel nach Herstellerangaben isoliert.

3.2.9 Isolierung chromosomaler DNA aus *Bacillus*

Eine 10 ml LB-Kultur wurde 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1,5 ml Resuspensionspuffer gewaschen und in 700 µl Lysispuffer resuspendiert, dann 10min auf Eis gelagert und anschließend 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl N-Laurylsarkosyl (30%) und 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) erfolgte die Inkubation bei 70°C 20 min.

Anschließend wurden die Ansätze 2 min auf Eis gekühlt. Die Ansätze wurden mit 700 µl Phenol gemischt, bei 13000 rpm 5 min zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Tube überführt. Dieser Schritt wurde 1-2 mal wiederholt bis die Interphase nicht mehr vorhanden war.

Die wässrige Phase wurde nun mit 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt, 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 5 µl

RNase wurden die Ansätze 15 min bei 37°C inkubiert, die DNA mit 1 ml Ethanol (96 %) 10 min auf Eis gefällt und 10 min bei 13000 rpm pelletiert.

Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 100 µl TE-Puffer bei RT über Nacht gelöst.

3.2.10 Bestimmung des Insertionsortes des Transposons

Diese Bestimmung wurde nach Le Breton et al. (52) durchgeführt.

Von den Transposonmutanten wurde chromosomale DNA isoliert. 5 µg der DNA wurden mit TaqI geschnitten und nach Aufreinigung mit dem Nucleospin Extract Kit mit dem Rapid Ligation Kit zirkularisiert (DNA Konzentration 5 ng/µl). Der Ligationsansatz wurde wiederum mit dem Nucleospin Extract Kit aufgereinigt und eine PCR mit einer Annealingtemperatur von 60°C bzw. 50°C mit den Primern oIPCR1 und oIPCR2 durchgeführt.

Der PCR-Ansatz wurde in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die durch Ethidiumbromid sichtbare DNA-Bande wurde unter schwachem UV-Licht ausgeschnitten und anschließend mit dem Nucleo Spin Extract Kit aufgereinigt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit dem Primer oIPCR3 sequenziert und die erhaltene Basensequenz mit Hilfe des Programmes BlastN identifiziert (1).

3.2.11 Auffüllen von „sticky ends“

Damit DNA-Enden mit „sticky ends“ von einer Restriktion mit einem DNA-Stück mit „blunt ends“ ligiert werden können, wurde die DNA mit den „sticky ends“ mit Klenow-Fragment nach Herstellerangaben behandelt.

3.2.12 Aufreinigen von DNA

Um DNA nach Modifikationsschritten für die weitere Bearbeitung aufzureinigen, wurde das Nucleo Spin Extract-Kit von Machery Nagel nach Herstellervorgaben verwendet.

3.2.13 Konstruktion von Integrationsplasmiden

Die Konstruktion von Integrationsplasmiden erfolgte jeweils nach einer der folgenden Methoden.

1. Ein ca. 3 kB langes PCR Produkt, welches das zu zerstörende Gen enthält, wird in den pGEM-T Vektor kloniert. Anschließend wird das Gen möglichst komplett mit Restriktionsendonucleasen ausgeschnitten und an dessen Stelle eine Resistenzkassette inseriert.
2. Die Resistenzkassette und die zwei flankierenden Bereiche für die homologe Rekombination werden separat in den puc- oder pGEM-T-Vektor kloniert.
3. Um Gene innerhalb eines Operons ohne Funktionsverlust der nachfolgenden Gene zu zerstören, wird mit Hilfe der SOE PCR das Gen genau durch ein Spectinomycinresistenzgen ersetzt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 SDS-PAGE

3.3.1.1 SDS-PAGE nach Laemmli (50)

Es wurden Polyacrylamidgele mit einem 4% igen Sammelgel und einem 20% igen Trenngel angefertigt. Nach dem Auftragen der Proben lief die Elektrophorese der Gele in einer mit Tris-Glycin Puffer gefüllten Elektrophoresekammer bei anfänglichen 80 V, nach Einlaufen in das Trenngel bei 160 V, um eine gute Auftrennung zu erreichen.

Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele aus der Kammer herausgenommen, 3 x 10 min in H₂O dest. gewaschen, über Nacht mit Coomassie gefärbt und abschließend in H₂O dest. bis zum Erreichen eines guten Kontrastes gewaschen.

3.3.1.2 SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow (78)

Es wurden Polyacrylamidgele mit einem 4% igen Sammelgel und einem 16,5-18% igen Trenngel angefertigt. Nach dem Auftragen der Proben lief die Elektrophorese der Gele in

einer mit Kathoden-Puffer (innen) und Anoden-Puffer (außen) gefüllten Elektrophoresekammer bei 30 mA. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele aus der Kammer herausgenommen, 3 x 20 min in Entfärber und 3 x 10 min in H₂O dest. gewaschen.

Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine für 1 h mit Coomassie und abschließend wurde das Gel in H₂O dest. bis zum Erreichen eines guten Kontrastes gewaschen.

3.3.2 PAS- Färbung zum Nachweis von Glycoproteinen auf PAA-Gelen

Bei der PAS (Periodic acid-Schiff) Färbung werden Periodat-oxidierte Glycoproteine mit Schiff's Reagenz umgesetzt (24).

Das SDS wurde zuerst 20 min mit Fixierlösung ausgewaschen. Anschließend wurde das Gel in 7 % iger Essigsäure 2 x 10 min gewaschen und anschließend 3 min in H₂O dest. Die Oxidation erfolgte mit 0,7 % iger Perjodsäure für 1 h. Das Gel wurde anschließend 3 x 10min mit 7 % iger Essigsäure gewaschen und daraufhin mit Schiff's Reagenz bedeckt, bis eine Pinkfärbung sichtbar wurde. Anschließend wurde das Gel mit 0,1 % Natriummetabisulfit (Na₂S₂O₅) 2 x 10 min gewaschen.

4 Ergebnisse

4.1 Amylocyclin A

4.1.1 Antibakterielle Aktivität der *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 *sfp*-Mutanten CH3 und RS6 gegen *Bacillus subtilis* HB0042

Aus der Genomanalyse von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 gab es keine Hinweise auf ribosomal hergestellte antibakterielle Substanzen wie Lantibiotika oder andere Bacteriocine (9); Helmann und Butcher zeigten jedoch, dass die *sfp*-Mutante CH3, die weder Polyketide noch Lipopeptide herstellen kann, mindestens eine Substanz produziert, die gegen *Bacillus subtilis* CU1065 und besonders gegen dessen *sigW*-Mutante HB0042 wirksam ist (Abbildung 10). SigW ist ein extrazellulärer Sigma Faktor, der Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen von anderen Bazillen vermittelt (6).

Das SigW-abhängige Operon *ydbST* scheint an der Resistenz von *Bacillus subtilis* gegenüber dieser, von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Stamm CH3 hergestellten Substanz, beteiligt zu sein (Abbildung 10).

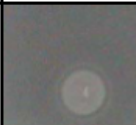







SPOT \ LAWN				CU1065	CU1065 <i>sigW</i>	CU1065 <i>fosB</i>	CU1065 <i>ydbST</i>
	Gene/s deleted	Compounds produced					
		Lipopeptides	Polyketides				
WT (FZB42)	none	fengycin, surfactin, bacillomycin	difficidin, bacillaene				
CH3	<i>sfp</i>	none	none				

Abbildung 10 Modifiziert aus Butcher und Helmann (6). Die von *B. amyloliquefaciens* FZB42 produzierte antimikrobielle Substanz ist weder ein Polyketid noch ein Lipopeptid. Genutzte *B. amyloliquefaciens* FZB42 Produktionsstämme synthetisieren die aufgeführten Polyketide und Lipopeptide. Beachte, dass der *sfpΔ* Stamm (Zeile 2) weder Polyketide noch Lipopeptide herstellt. Alle Spot-on-lawn Assays wurden auf 1,5% LB Agar durchgeführt.

Auch die Mutante RS6 (*sfp* Δ , *bac* Δ), die alle von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 bekannten nicht-ribosomal hergestellten antimikrobiellen Substanzen nicht mehr produzieren kann, besitzt Aktivität gegen *Bacillus subtilis* (Abbildung 11).

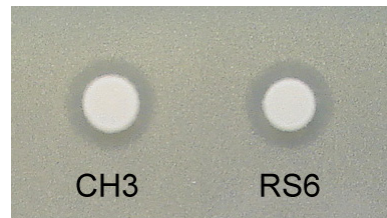


Abbildung 11 Spot-on-Lawn Test auf *Bacillus subtilis* HB0042 mit den *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Mutanten-Stämmen CH3 (*sfp* Δ) und RS6 (*sfp* Δ , *bac* Δ)

Da es sich um eine unbekannte Substanz handelte und es deswegen nicht bekannt war, ob es sich um ein ribosomal hergestelltes Peptid, Protein, oder um eine enzymatisch zusammengesetzte Substanz handelte, sowie keine Gencluster für die Synthese weiterer antibakterieller Substanzen bekannt waren, wurde versucht auf genetischer Ebene der Natur der Substanz näher zu kommen.

Dafür wurde die Transposonmutagenese genutzt. Dabei springt das Transposon von dem Plasmid pMarA an eine zufällige Stelle im Genom und zerstört dabei die Funktion des Gens, in dessen Sequenz es inseriert hat. Alle dabei entstandenen Mutanten wurden dann in einem Aktivitätstest auf den Verlust der antibakteriellen Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* untersucht. Die Mutanten, die die antibakterielle Aktivität verloren hatten, wurden selektiert. Der Integrationsort des Transposons kann mit Hilfe der DNA-Sequenzierung bestimmt werden. Gene, die durch das Transposon ausgeschaltet wurden, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit in die Synthese der gesuchten antibakteriellen Substanz involviert. Wenn das zerstörte oder die umgebenen Gene homolog zu Genen aus bekannten Biosyntheseclustern sind, kann ein Rückschluss auf die vermutliche chemische Natur der Substanz gezogen werden,

Die Mutante WY01 (Yuan Wang) trägt die Insertion des Transposons im Gen *RBAM_029230* und weist einen Verlust der Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* auf (Abbildung 12).

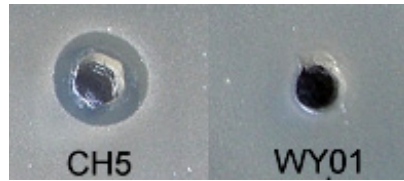


Abbildung 12 Aktivitätstest auf *Bacillus subtilis* HB0042, mit 100µl Überstand einer Kultur in Diabrot-Medium vom Ende der log-Phase von CH5 und WY01

Das Cluster um *RBAM_029230* weist eine geringe Ähnlichkeit zum Uberolysin-Biosynthesecuster auf. Uberolysin ist ein zirkuläres Bacteriocin aus *Streptococcus uberis*. Aus diesem Grund war zu vermuten, dass es sich bei dem Produkt des Genclusters um *RBAM_029230* um ein zirkuläres Peptid handelt und dies die gesuchte antibakterielle Substanz gegen *Bacillus subtilis* ist. Um diese Vermutung weiter zu bestätigen, wurde das Gencluster näher untersucht.

4.1.2 Gencluster um *RBAM_029230*

Das Operon um *RBAM_029230* umfasst sechs Gene, *acnA-F* (Abbildung 14 und Tabelle 12), wobei sich *acnB* und *acnD* überlappen. Vor jedem Gen befindet sich eine Shine-Dalgarno-Sequenz am Ende des jeweils davor liegenden Gens.

Anhand der Ähnlichkeit zum Uberolysin-Cluster konnten die Funktionen der Gene teilweise vermutet werden. Um die Funktion der Gene genauer zu bestimmen, wurden Mutanten hergestellt. Damit die dahinterliegenden Gene funktionstüchtig bleiben, wurde das betreffende Gen jeweils genau durch ein Spectinomycinresistenzgen ersetzt, bei überlappenden Genen unter Beibehaltung der Ribosomenbindestelle im vorherigen Gen.

AcnA ist der Peptid-Präkursor und besteht aus 112 AS.

Beim Vergleich der MALDI-TOF MS Spektren (90) des Methanolextraktes der Ammoniumsulfatfällung des Überstandes von Stamm RS6 (Abbildungen 13A) und der *acnA*-Mutante RS17 (Abbildungen 13B), die die antibakterielle Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* verloren hat (Abbildung 15), konnte die Masse für das Peptid auf 6382 Da $[M+H]^+$ bestimmt werden.

Durch den Vergleich mit dem Uberolysin-Präkursor und Bestimmung des vermutlichen Leader-Peptids ergibt sich ein Molekulargewicht von 6399,62 für das *acnA*-Produkt. Die

Masse ist jedoch 18 Da geringer ($6382 \text{ Da } [M+H]^+$), was den vermuteten Ringschluss bestätigt.

Demnach entfallen 48 Aminosäuren des 112 Aminosäuren langen Präkursors auf das relativ lange Leader-Peptid und 64 Aminosäuren auf das eigentliche Bacteriocin.

Aufgrund der Homologie zu Uberolysin, welches zu der Gruppe I der zirkulären Bacteriocine gehört, dem Ringschluss (cyclic) und der Tatsache, dass alle bekannten *amyloliquefaciens*-Stämme dieses Gencluster tragen, wurde die peptidische antibakterielle Substanz mit der Masse $6382 \text{ Da } [M+H]^+$ „**Amylocyclicin A**“ (Acn) benannt.

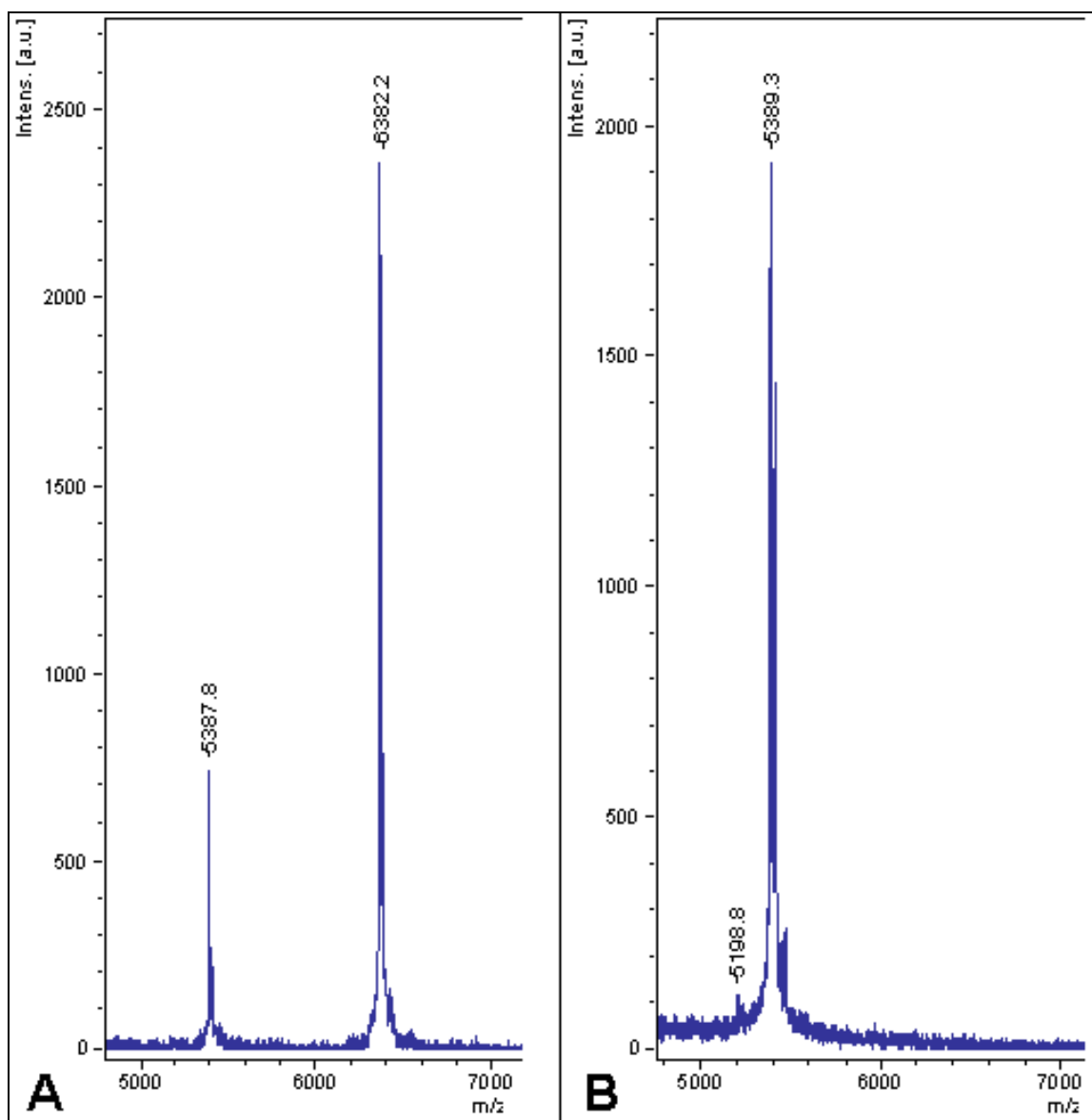


Abbildung 13 MALDI-TOF-MS des methanolischen Extraktes der Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstandes von RS6 (A) und (B) RS17. Die Masse m/z 6382.2 fehlt in der Probe des Stammes RS17 und belegt, dass das reife Produkt von *acnA* die Masse 6382 $[M+H]^+$ hat

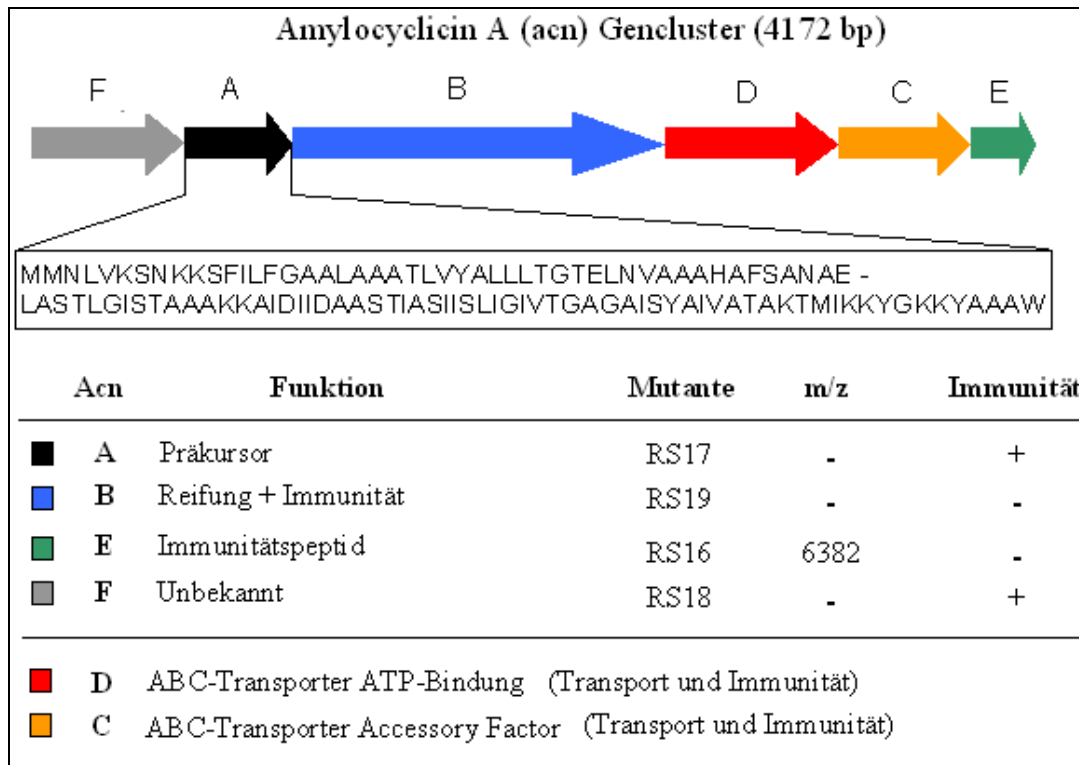


Abbildung 14 Übersicht über das Acn Gencluster. Funktion der beteiligten Gene; Namen der Mutanten im Gencluster und der Einfluss der Gene auf die Existenz der Amylocyclicin A Masse (m/z 6382 $[M+H]^+$ in MALDI-TOF-MS Messungen und auf die Selbstimmunität, + bedeutet ist präsent, - bedeutet ist nicht präsent; - putative Peptidaseschnittstelle im Peptidpräkursor AcnA

AcnF und AcnB sind hypothetische Proteine, welche keine starke Homologie zu bekannten Proteinen haben. Sie sind jedoch beide für die Produktion von Amylocyclicin A essentiell. Ohne diese Gene kann Amylocyclicin A weder in MALDI-TOF-MS Messungen nachgewiesen werden, noch beobachtet man eine antibakterielle Aktivität gegen *Bacillus subtilis* HB0042 (Abbildungen 15, 17 und 19).



Abbildung 15 Bioassay mit je 50µl Überstand der Acn-Mutanten auf *B. subtilis* HB0042

AcnF-Homologe finden sich nicht in den Clustern von bekannten zirkulären Bacteriocinen. AcnF zeigt schwache Homologie zu einer ATP-abhängigen Clp-Protease aus *Enterococcus faecalis* S613 (27%) und könnte somit für das Abschneiden des Leader-Peptids verantwortlich sein.

Eine schwache Homologie zeigt sich außerdem zu einem ABC-Transporter aus *Lactobacillus ultunensis* DSM 16047 (45%), was für eine Funktion im Export spricht.

Weiterhin möglich ist auch eine Funktion als Regulator aufgrund einer schwachen Homologie zu einer Zwei-Komponenten Sensor-Histidinkinase aus *Clostridium* sp. 7_2_43FAA (35%) und einem Response-Regulator Empfänger-Protein aus *Enterococcus faecalis* S613 (18%).

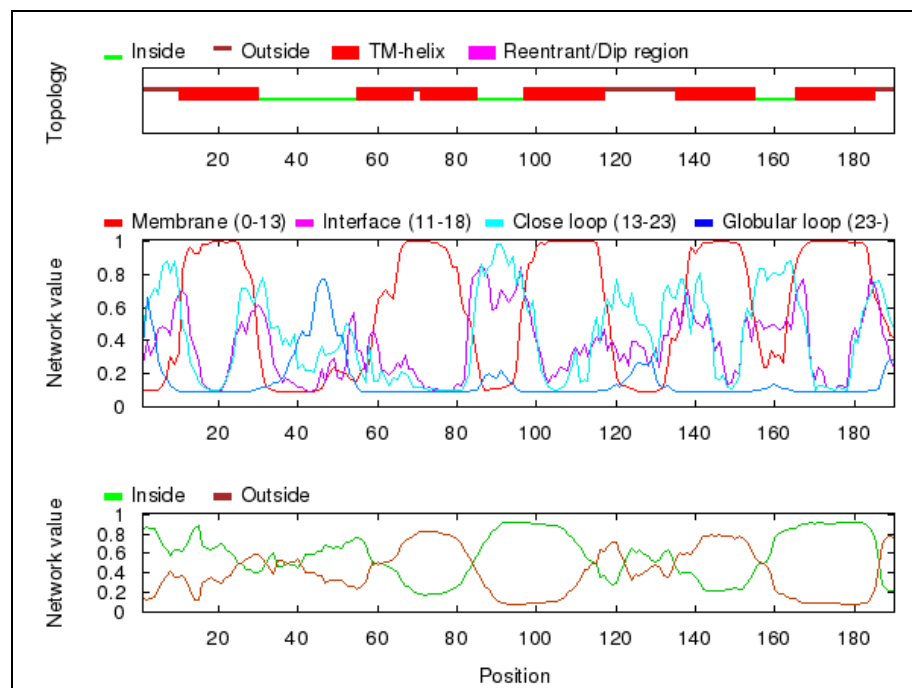


Abbildung 16 sechs vorhergesagte Transmembranhelices für AcnF nach Octopus (92)

Im Uberolysin-Cluster befindet sich an der Stelle von *acnF* ein *ORF1*-Gen in entgegengesetzter Richtung, das einen putativen Response-Regulator kodiert, was für AcnF als Regulator sprechen würde. AcnF besitzt jedoch sechs vorhergesagte Transmembranhelices (Abbildung 16), was eine Rolle als Regulator unwahrscheinlich macht. Die Funktion von AcnF bleibt somit vorerst unbekannt.

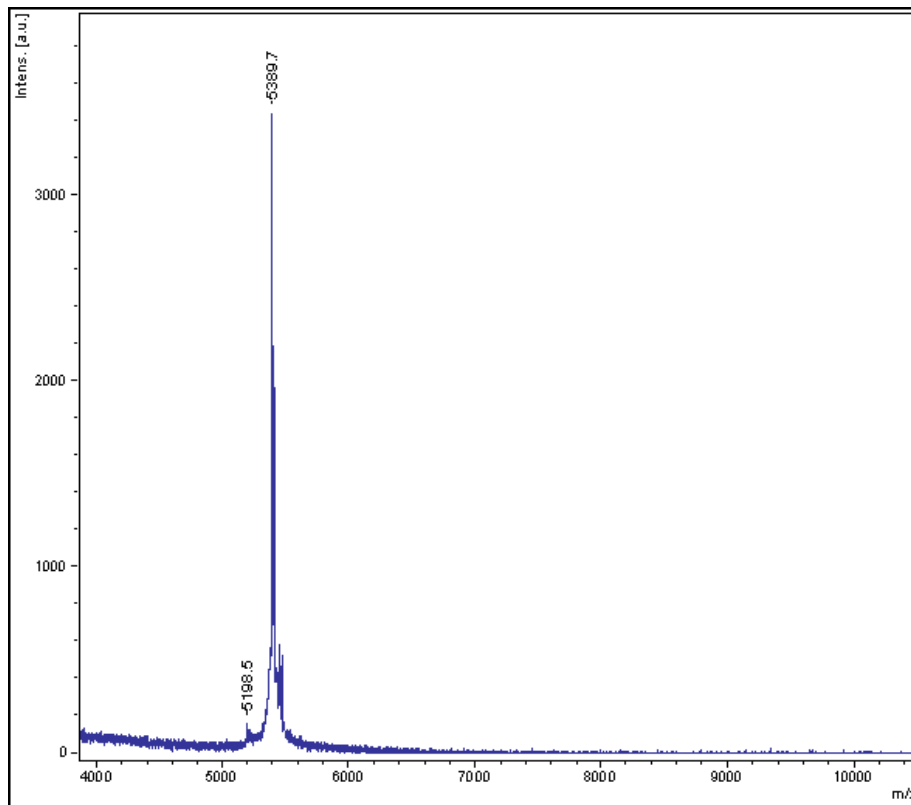


Abbildung 17 MALDI-TOF-MS des methanolischen Extraktes der Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstandes von RS18

AcnB, mit 12 vorhergesagten Transmembranhelices (Abbildung 18), weist ebenfalls keine Homologie zu bekannten Proteinen der zirkulären Bacteriocine auf. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Uberolysin Cluster könnte AcnB, von der Lage des Gens innerhalb des Operons und der Größe, die gleiche Funktion wie UblB haben, ein Membranprotein mit putativer Reife- und Zirkularisierungs- Funktion, bzw. AS-48B, das auch 12 Transmembranhelices besitzt (58).

AcnB weist schwache Homologie zu BacB aus *Enterococcus faecalis* auf (27%). BacB ist ein plasmidkodiertes Immunitätsprotein für das *bacA*-kodierte Bacteriocin (82).

Schwache Homologien finden sich außerdem zu einem ABC-Transporter (ATP-Binde- / Permease- Protein) aus *Streptococcus uberis* 0140J (21%), zu einer Peptidase M61 aus *Neisseria flavescens* SK114 (41%) und einem putativen ABC-Transporter aus *Ixodes scapularis* (27%).

Zu vermuten ist demnach eine Funktion in der Reifung und Zirkularisierung. Eventuell übernimmt AcnB, in Zusammenarbeit mit dem ABC-Transporter, die Zyklierung des Peptides, das Abschneiden des Leader-Peptids und den Export.

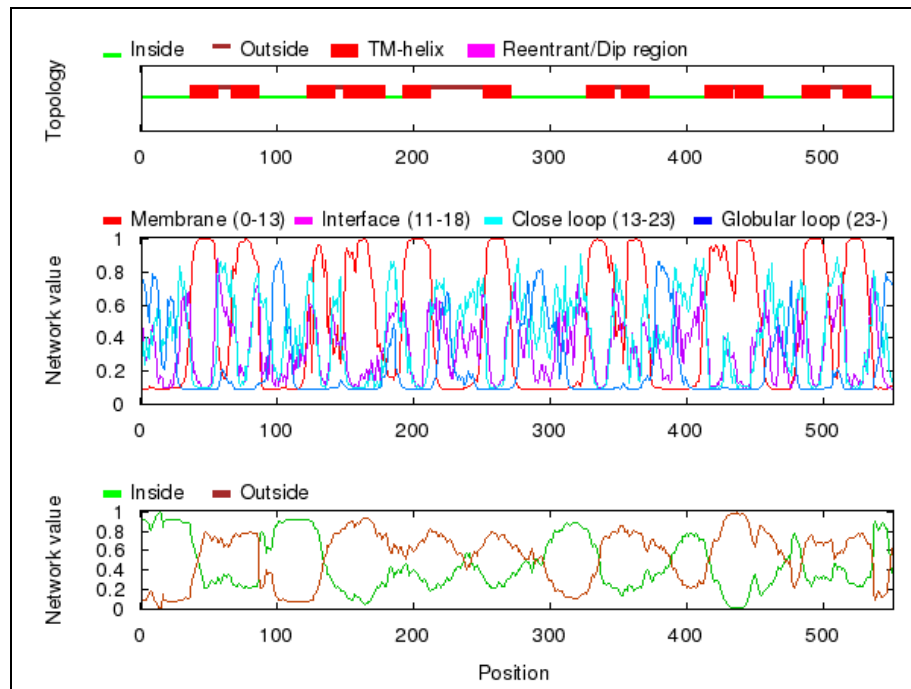


Abbildung 18 zwölf vorhergesagte Transmembranhelices für AcnB nach Octopus (92)

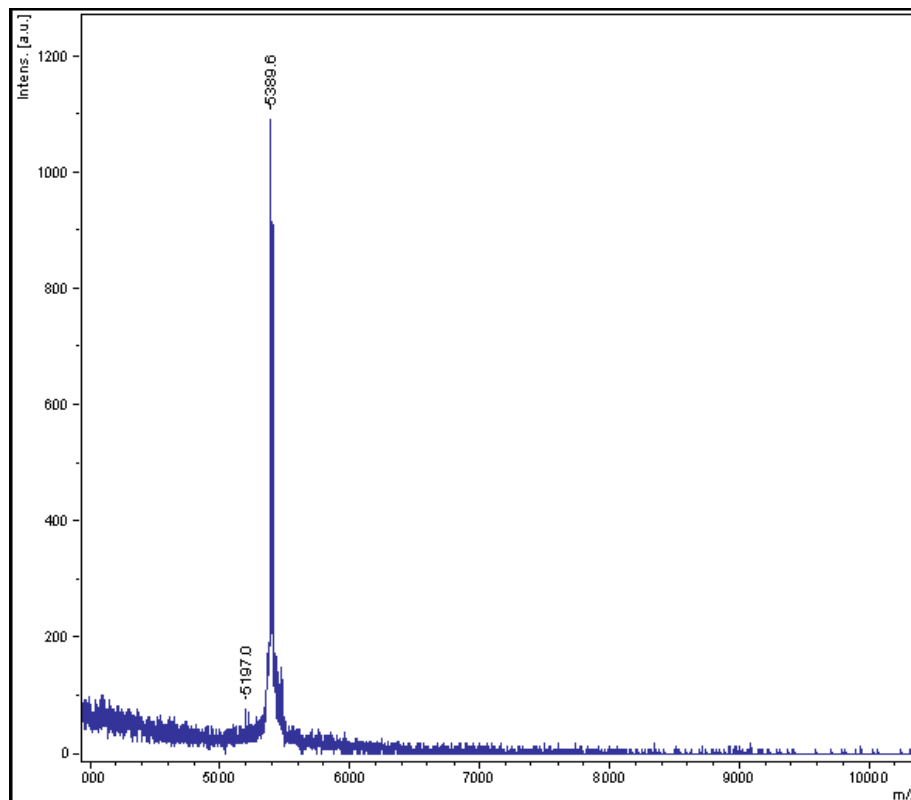


Abbildung 19 MALDI-TOF-MS des methanolischen Extraktes der Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstandes von RS19

Für AS-48 wird vermutet, dass das große Membranprotein AS-48B allein oder mit dem Export-ABC-Transporter C₁D zusammen eine Pore für den Austritt des AS-48 Moleküls bildet (58). Dies könnte auch für Amylocyclicin mit AcnB und dem ABC-Transporter zutreffen.

AcnD ist das ATP-Binde-Protein des ABC-Transporters. **AcnC** ist ein zum ATP-Transporter gehöriges integrales Membranprotein der DUF95 Familie mit vier putativen Transmembranhelices (Abbildung 20).

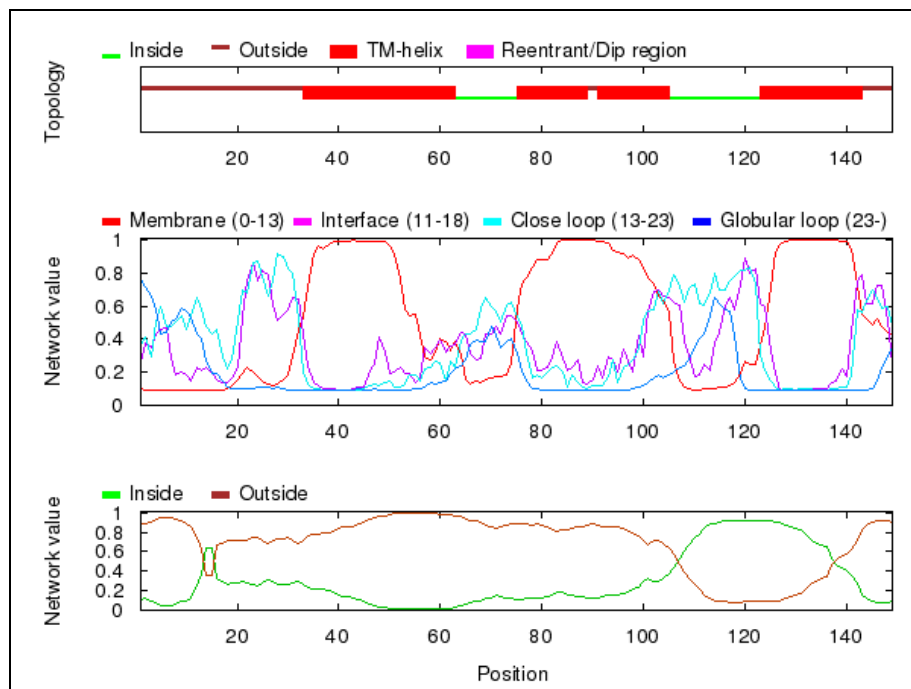


Abbildung 20 vier vorhergesagte Transmembranhelices für AcnC nach Octopus (92)

Für *acnD* und *acnC* konnten keine Mutanten erstellt werden. Diese Gene kodieren den putativen ABC-Transporter, der für den Export des Bacteriocins zuständig ist. Dieser scheint für die Immunität essentiell zu sein, so dass eine Mutation dieser Gene letal ist.

AcnE ist nicht für die Produktion von Amylocyclicin A notwendig, da die Mutante RS16 die Substanz noch produzieren kann (Abbildungen 15 und 22). AcnE entspricht aufgrund seiner kleinen Größe, der starken Ladung und der vermutlichen Membranassoziation mit drei vorhergesagte Transmembranhelices (Abbildung 21), den typischen Immunitätspeptiden der Bacteriocine.

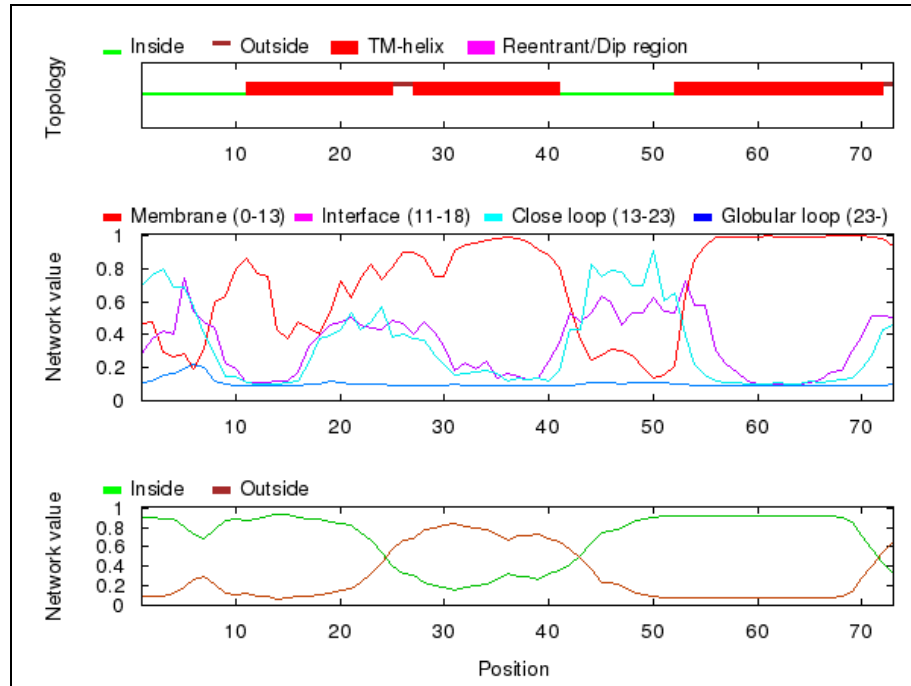


Abbildung 21 drei vorhergesagte Transmembranhelices für AcnE nach Octopus (92)

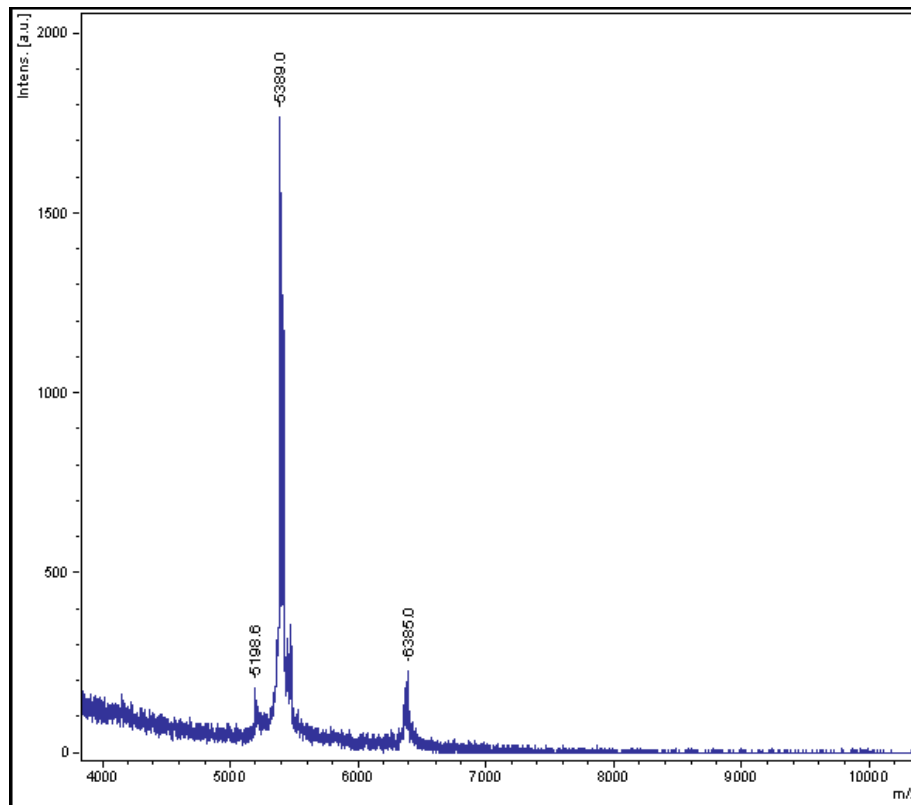


Abbildung 22 MALDI-TOF-MS des methanolischen Extraktes der Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstandes von RS16

Tabelle 12 Zusammenfassung des Amylocyclicin A-Genclusters

Gen	Name	AS	pI	Homologie	Funktion
<i>RBAM_029240</i>	<i>acnF</i>	190	9.39	Hypothetisches Protein (6 TM)	Unbekannt
<i>RBAM_029230</i>	<i>acnA</i>	112	9.75* ¹ / 9.8* ²	Zirkuläres Bacteriocin	Präkursor
<i>RBAM_029220</i>	<i>acnB</i>	551	9.66	Hypothetisches Protein (12 TM)	Bearbeitung, Immunität
<i>RBAM_029210</i>	<i>acnD</i>	234	5.76	Putatives ABC- Transporter ATP- Bindepotein	ABC-Transporter- ATP-Bindung
<i>RBAM_029200</i>	<i>acnC</i>	149	7.76	Integrales Membran- protein DUF95 (4 TM)	ABC-Transporter- Zusatz-Faktor
<i>RBAM_029190</i>	<i>acnE</i>	73	9.70	Hypothetisches Protein (3 TM)	Immunität

*¹ mit Leader-Peptid *² ohne Leader-Peptid;

TM: Transmembranhelices (nach Octopus (92))

4.1.3 Vergleich des Amylocyclicin A-Clusters mit dem Uberolysin-Gencluster

Amylocyclicin A weist bezüglich der Präkursoraminosäuresequenz und dem Genclusteraufbau Ähnlichkeit zu dem zirkulären Bacteriocin Uberolysin auf.

Das Uberolysin-Cluster besteht ebenfalls aus sechs Genen (mit *ORF1*), das bis auf das erste Gen (*ORF1*), ähnlich dem Amylocyclicin A-Cluster aufgebaut ist (Abbildung 23).

Beide Cluster besitzen Gene für einen Peptidpräkursor, die von einem langen Gen für ein vermutliches Membranprotein mit putativer Zirkularisierungsfunktion gefolgt werden. Anschließend folgen die zwei Gene für den ABC-Transporter, deren Reihenfolge jedoch vertauscht ist und abschließend das Immunitätsgen.

Im Gegensatz zum Uberolysin-Cluster wird das Amylocyclicin A-Cluster nicht von „Direct Repeats“ flankiert.

Der größte Unterschied besteht am Anfang des Clusters. Im Amylocyclicin A-Cluster befindet sich an erster Stelle im Operon das *acnF* Gen, das für ein unbekanntes Protein mit Einfluss auf die Synthese kodiert. Im Uberolysin-Cluster befindet sich an dieser Stelle außerhalb des Operons ein *ORF1* in entgegengesetzter Richtung, der einen vermutlichen Regulator kodiert.

Abbildung 23 Amylocyclicin A- und Uberolysin-Gencluster

```

AcnA MMNLVKS NKKSFILEGAALAAATLVYALLLTGTELVAAAHAFSANAELASTLGISTAA
UblA -----MDILLELAGYTGIASGT
                                     :.   ***.  **:.:.:
AcnA AKKAIDI IDAASTIASIISLIGIVTGAGAI SYA-----IVATAKTMIKKYGKKYAAAW
UblA AKKVVD AIDKGAAAFV IISIISTVISAGALGAVSASADFIILT VKNYISRNLKAQAVIW
    ***.:* **  :.:   ***:*. * .***:.. .           *: *. * .*: * *. *

```

Abbildung 24 Homologie der Peptide AcnA und UblA (Leader-Peptid in blau) (CLUSTAL W (87))

besitzen keine konservierten Erkennungssequenzen für eine Protease, was typisch für die Gruppe I der zirkulären Bacteriocine ist. Dies steht im Gegensatz zu den „normalen“ Bacteriocinen, die üblicherweise nach einem Doppel-Glycin geschnitten werden.

Martin-Visscher et al. postulierten für alle zirkulären Bacteriocine eine globuläre 3D-Struktur mit vier bis fünf Helices (59).

Um zu untersuchen, ob Amylocyclicin A auch eine ähnliche globuläre Sekundärstruktur besitzt, wurde die Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programmes „JPRED“ (14) analysiert. Zum Vergleich wurden die vorhergesagten Sekundärstrukturen von Carnocyclin A und Uberolysin herangezogen (59).

CclA ^{*1}	-LVAYGIAQGTAEKVVS LINAG---LTVGSIIS-ILG-G-----VTVGLSGVFTAVKAAIAKQGIKKAIQL
Uber ^{*1}	LAGYTGIA SGTAKKVVD AIDKGAAAFV IISIISTVISAGALG-AVSASADFIILT VKNYISRNLKAQAVIW
Acn ^{*2}	LASTLGISTAAAKKAIDIIDAAS TIASIISLIGIVTGAGAI SYA-----IVATAKTMIKKYGKKYAAAW

Abbildung 25 3D-Strukturvorhersage für zirkuläre Bacteriocine, pinkfarben: helikale Strukturen, türkisfarben: gestreckte Strang- oder helikale- Struktur; ^{*1} Strukturvorhersage für Carnocyclin A (CclA) und Uberolysin (Uber), modifiziert aus Martin-Visscher et al. (59), ^{*2} JPRED Strukturvorhersage für Amylocyclicin A (Acn) (14);

Aus dieser 3D-Strukturvorhersage ist anhand von Abbildung 25 ersichtlich, dass Amylocyclicin A auch helikale Strukturen enthält und somit vermutlich auch eine globuläre 3D-Struktur besitzt.

4.1.4 Selbst-Immunität gegenüber Amylocyclicin A

Um zu untersuchen, welche der Gene des Amylocyclicin A-Clusters in die Immunität involviert sind, wurden die Mutanten des Clusters selbst als Indikatorstämme in einem Bioassay eingesetzt. Immunitätsproteine der zirkulären Bacteriocine sind kleine kationische Peptide wie AcnE, die oft in Zusammenarbeit mit einem ABC-Transporter volle Immunität bieten. Im Spot-on-lawn-Test reagierte die *acnE*-Mutante RS16 sensitiv (Abbildung 26C, linker Spot). Dies ist ein Nachweis für die Immunitätsfunktion von AcnE. Auffällig ist, dass die Mutante von *acnB*, RS19, viel sensitiver ist (Abbildung 26D, linker Spot). Das unbekannte Produkt von *acnB*, mit zwölf vorhergesagten Transmembranhelices,

hat also eine erhebliche Funktion in der Selbst-Immunität gegenüber Amylocyclicin A, und könnte zusammen mit dem Transporter an dem Export der Substanz beteiligt sein.

Die komplette Deletion des Clusters in der WY06-Mutante (Yuan Wang) führte zu einer sehr starken Sensibilität gegenüber Amylocyclicin A (Abbildung 26B, linker Spot). Dies könnte durch das gleichzeitige Fehlen von *acnE* und *acnB* begründet werden und/oder durch das Fehlen des ABC-Transporters.

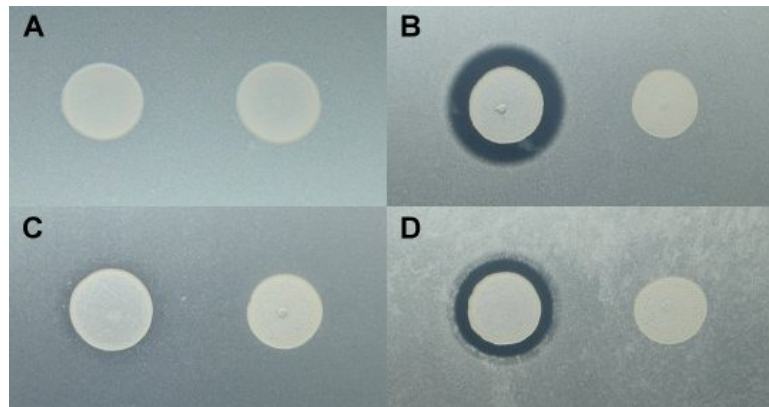


Abbildung 26 Spot-on-lawn-Test auf Indikatorbakterien, linker Spot je RS6, rechter Spot je RS17; A: RS6, B: WY06, C: RS16, D: RS19

Da für die ABC-Transporter-Gene keine Mutanten gewonnen werden konnten, ist es möglich, dass der ABC-Transporter eine Hauptaufgabe in der Immunität hat, unterstützt durch das Membranprotein AcnB und das Immunitätspeptid AcnE.

Im Gegensatz zu Enterocin AS-48 und Circularin A, bei denen es neben einem Immunitätsgen zwei ABC-Transporter für Sekretion und Immunität gibt, scheint der ABC-Transporter hier für Beides zuständig zu sein.

Für AS-48 wird vermutet, dass das große Membranprotein AS-48B allein oder mit dem Export-ABC-Transporter C₁D zusammen eine Pore für den Austritt des AS-48 Moleküls bildet (58). Dies könnte auch für Amylocyclicin A mit AcnB und dem ABC-Transporter zutreffen.

4.1.5 Amylocyclicin A hat starke Aktivität gegen grampositive Bakterien

Amylocyclicin A wurde als aktive antibakterielle Substanz gegen *Bacillus subtilis* identifiziert und es wurde gezeigt, dass Amylocyclicin A zu der Gruppe I der zirkulären Bacteriocine gehört.

Mitglieder der zirkulären Bacteriocine haben eine starke antibakterielle Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien. Deswegen bot es sich nun an zu untersuchen, ob Amylocyclicin A auch eine starke antibakterielle Wirkung gegenüber anderen grampositiven Bakterien als *Bacillus subtilis* besitzt.

Eine starke antibakterielle Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien zeigte sich im Spot-on-lawn-Test und in einem Bioassay mit dem Kulturüberstand von RS6 vom Ende der logarithmischen Phase (Abbildungen 15 und 27, Tabelle 13).

Besonders sensitiv gegenüber Amylocyclicin A waren dabei *Micrococcus luteus*, *Clavibacter michiganensis* und *Bacillus sphaericus* (Abbildung 27). Eine Wirkung gegen gramnegative Bakterien, wie *Escherichia*, *Klebsiella* oder *Erwinia*, war nicht zu finden. (Tabelle 13).

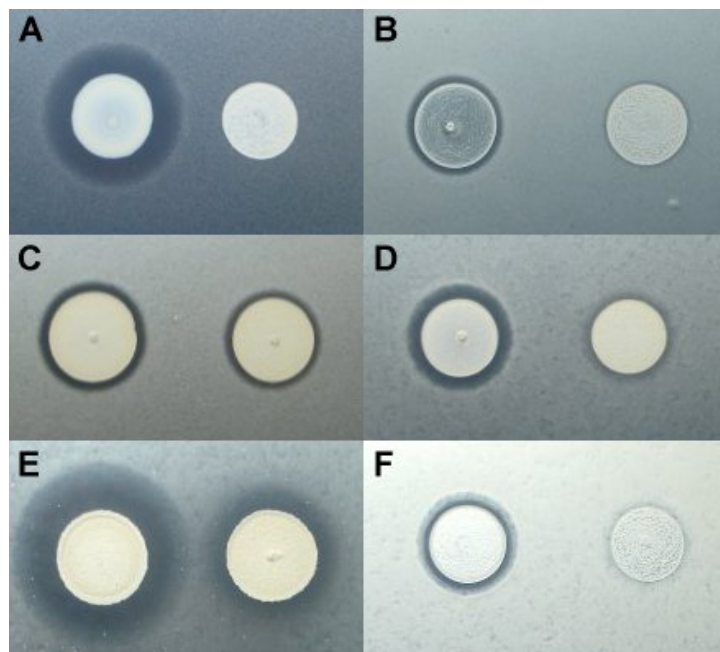


Abbildung 27 Spot-on-lawn-Test auf Indikatorbakterien; linker Spot RS6 (+Acn), rechter Spot RS17 (-Acn)

A: *Micrococcus luteus*, B: *Bacillus subtilis* 168, C: *Bacillus licheniformis*, D: *Bacillus sphaericus*,
E: *Clavibacter michiganensis*, F: *Bacillus megaterium*

Tabelle 13 Antibakterielle Aktivität von Amylocyclicin A gegen Indikatorbakterien

Indikatorstamm	Sensitivität ^a	Indikatorstamm	Sensitivität ^a
<i>Bacillus brevis</i>	++	<i>Bacillus sphaericus</i>	++
<i>Bacillus subtilis</i> 168	+	<i>Bacillus subtilis</i> OKB105	+
<i>Bacillus cereus</i>	++	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	+
<i>Clavibacter michiganensis</i>	++	<i>Paenibacillus granivorans</i>	++
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	<i>Bacillus megaterium</i>	++
<i>Paenibacillus validus</i>	++	<i>Micrococcus luteus</i>	++
<i>Bacillus subtilis</i> CU1065	+	<i>Bacillus pumilus</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i> HB0042	++	<i>Klebsiella terrigena</i>	-
<i>Arthrobacter spez.</i>	-	<i>Pseudomonas</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Erwinia caratovora</i>	-
<i>E. coli</i> K12	-		

^a Grad der Hemmung im Bioassay: ++: starke Hemmung; +: Hemmung; -: keine Hemmung

4.1.6 SigW in *Bacillus subtilis* ist in die Resistenz gegenüber Amylocyclicin A und andere Substanzen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 involviert

Helmann und Butcher postulierten, dass *B. amyloliquefaciens* FZB42 eine Substanz produziert, die gegen *B. subtilis* CU1065 wirksam ist und besonders gegen dessen *sigW* Mutante HB0042 (6). Da sie für ihre Untersuchungen eine *sfp* Mutante nutzen, ist sicher, dass es sich nicht um eine nicht-ribosomal hergestellte Substanz von Polyketidsynthasen (PKS) oder nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) handelt.

Amylocyclicin A konnte als verantwortliche antibakterielle Hauptsubstanz identifiziert werden (Abbildungen 12, 15 und 28).

Bacillus subtilis 168 und dessen Phagen-Mutante CU1065 (*attSPβ*) sind sensitiv gegenüber Amylocyclicin A, wie in Abbildung 28 A+C (linker Spot) ersichtlich ist. Der Amylocyclicin A Produzent RS6 hat eine Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis*, die Amylocyclicin A-Mutante RS17 besitzt keine.

Die jeweiligen *Bacillus subtilis sigW*-Mutanten sind viel stärker sensitiv gegenüber dem vom Stamm RS6 produzierten Amylocyclicin A als der Wildtyp. (Abbildungen 28 B+D, je linker Spot).

Die Amylocyclicin A-Mutante RS17 weist eine stark verminderte Aktivität auf (Abbildungen 28 B+D rechter Spot).

Somit ist nachgewiesen, dass SigW *Bacillus subtilis* Resistenz gegenüber Amylocyclicin A verleiht.

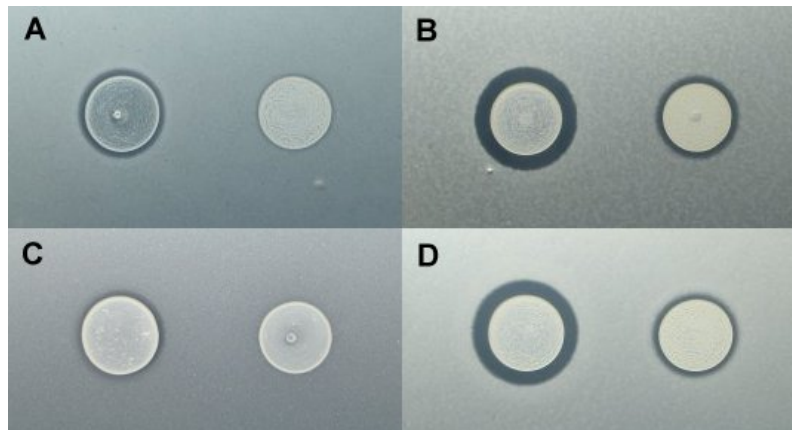


Abbildung 28 Einfluss von *sigW* auf die Immunität von *B. subtilis* gegenüber antibakteriellen Substanzen, die von *Bacillus amyloliquefaciens* gebildet werden. linker Spot je RS6, rechter Spot je RS17.

Indikatorbakterien: A: *B. subtilis* 168, B: HB10102, C: CU1065, D: HB0042

Neben der Resistenz gegenüber Amylocyclicin A scheint SigW aber auch an der Resistenz gegenüber anderen noch unbekannten Produkten von FZB42 beteiligt zu sein.

Die Amylocyclin A-Mutante RS17 hatte im Spot-on-lawn Test gegen *Bacillus subtilis* 168 und CU1065 kaum einen Effekt (Abbildung 28 A und C, rechter Spot), gegenüber den jeweiligen *sigW*-Mutanten jedoch eine deutlich sichtbare Aktivität (Abbildungen 28 B+D rechter Spot).

Somit sind die *sigW*-Mutanten sensitiv gegenüber einer anderen Substanz als Amylocyclicin A. Welche Substanz für diese Restaktivität verantwortlich ist, bleibt vorerst unbekannt.

Das SigW-abhängige Operon *ydbST* scheint in *Bacillus subtilis* in hohem Maße an der Resistenz gegenüber Amylocyclicin A beteiligt zu sein: Die *ydbST*-Mutante (Abbildung 29A linker Spot) ist annähernd so sensitiv gegenüber Amylocyclicin A wie die *sigW*-Mutante (Abbildung 28D linker Spot).

Die *ydbST*-Mutante ist weiterhin aber nur gegen Amylocyclicin A sensitiv, da die Amylocyclicin A-Mutante RS17 gegen diese *ydbST*-Mutante HB6213 so gut wie keine Aktivität zeigt (Abbildung 29A rechter Spot); gegenüber dem *sigW*-Mutantenstamm aber eine Aktivität aufweist (Abbildung 28D rechter Spot).

Somit ist nachgewiesen, dass das SigW-abhängige Operon *ydbST* für die Resistenz gegenüber Amylocyclicin A verantwortlich ist und es noch weitere SigW-abhängige Gene in *Bacillus subtilis* geben muss, die gegen noch unbekannte antibakterielle Substanzen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 Immunität bieten.

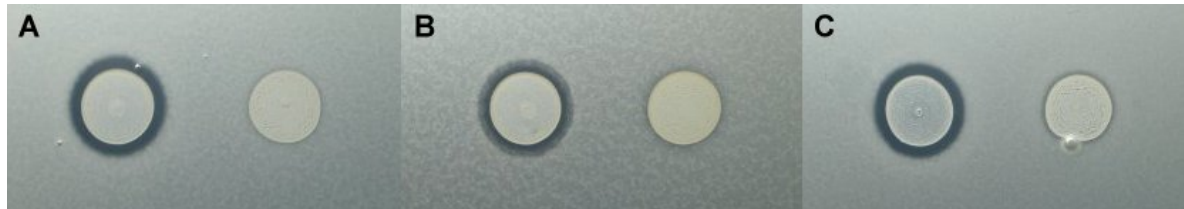


Abbildung 29 Spot-on-lawn Test auf *B. subtilis* Mutanten, linker Spot je RS6, rechter Spot je RS17; A: HB6213 (*ydbST::kan*), B: HB0008 (*fosB::cm*), C: HB6131 (*ydbST::kan fosB::cm*)

Butcher und Helmann vermuten eine Fosfomycin-ähnliche Substanz in *B. amyloliquefaciens* FZB42 (6). Die *Bacillus subtilis* *fosB*-Mutante zeigte jedoch keine erhöhte Sensitivität gegenüber einer von *B. amyloliquefaciens* FZB42 produzierten Substanz, so dass davon auszugehen ist, dass unter diesen Testbedingungen keine Fosfomycin-ähnliche Substanz produziert wird (Abbildung 29 B+C, rechter Spot).

4.1.7 Amylocyclicin A-ähnliche zirkuläre Bacteriocine in anderen Bakterien

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* ATCC 6633, *Bacillus coagulans* 36D1 und *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* BRL-230010 besitzen Gene, deren putative Produkte sehr hohe Ähnlichkeit zu den Proteinen des Amylocyclicin A-Clusters aufweisen (Tabelle 14 und Abbildung 30).

Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass diese Stämme eine Amylocyclicin A-ähnliche Substanz produzieren, sofern die Cluster intakt und aktiv sind.

Auf der Grundlage des Clustal W-Sequenzvergleiches (87) (Abbildung 30) liegt die Vermutung nahe, dass die Leader-Peptide an dem gleichen Ort wie bei Amylocyclicin A gespalten werden (vor „LAST“).

Die vermutlichen Leader-Peptide weisen große Sequenzunterschiede auf (Abbildung 30). Die Erkennung durch die Leader-Peptidase wird, wie bei den anderen Vertretern der Gruppe I der zirkulären Bacteriocine, vermutlich nicht in der Aminosäuresequenz

Ergebnisse

begründet liegen. Die für Bacteriocine typischen Doppel-Glycine oder sonstige konservierte Sequenzen sind bei keinem Vertreter der zirkulären Bacteriocine vorhanden.

Tabelle 14 Cluster-BlastP (2) (Identität in %)

Bacillus amyloliquefaciens FZB42

<i>acnF</i>	<i>acnA</i>	<i>acnB</i>	<i>acnD</i>	<i>acnC</i>	<i>acnE</i>
-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* ATCC 6633 BSU6633_

11880 88%	11885 97%	11890 85%	11895 90%	11900 86%	11905 84%
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Bacillus coagulans 36D1 BcoaDRAFT_

5689 36%	5690 62%	5691 36%	5692 55%	5693 44%	5694 47%
-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

Paenibacillus larvae subsp. *larvae* BRL-230010 Plarl_

02053 46%	02048 80%	02043 51%	02038 72%	02033 56%	02028 55%
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Die Länge der Präkursoren entspricht der von Amylocyclicin A mit 112 AS (*Bacillus coagulans* 36D1), bzw. ist um eine Aminosäure kürzer (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 und *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* BRL-230010). Auf die reifen Peptide entfallen jeweils 64 Aminosäuren.

acnA	MMNLVKSNNKSFILFGAALAAATLVYALLLTGTELNVAAAHAFSANAELAST
bsu6633	-MNLVKSNNKSFVLFGAALAAATLVYALLLTGTELNVAAAHAFSANAELAST
plarl	-MNLVKSNNKVIVLLGLGLVSTSLLYMFLLTGTNLGVTPVQGFSGNAELAST
bcoa	MVNSLTNNKRVFLFVVLGLVLATLSSVAYISTLQITIHTAVLPGNAYLAST
	:* :...*: :... :.* :.* : : : : :...** ****
LGISTAAAKKAIDI IDAASTIASI ISLIGIVTGAGAI SYAIVATAKTM IKKYGKKYAAAW LGISTAAAKKAIDI IDAASTVASI ISLIGIVTGAGAI SYAIVATAKSM IKKYGKKYAAAW LGISTAAAKKAIDI IDAASTIASI ISLIGIVTGAGAVSYAIVATAKTM IKKYGKKYAAAW LGISTAAAKKAIDI IDTASTIASI ISLIGVVTGAGAI SYAVVATAKAM IKKYGKKYAAAW *****:***:*****:*****:***:*****:*****:*****	

Abbildung 30 Sequenzvergleich mit CLUSTAL W (87) des Amylocyclicin A-Präkursors mit den putativen Präkursoren von *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633, *Bacillus coagulans* 36D1 und *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* BRL-230010; vermutliches Leader-Peptid in blau

Die vermutlichen Massen für die zirkulären Produkte sind 6353 Da (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus coagulans*) und 6367 Da (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*)

(94). Die putativen reifen Peptide weisen geringe Sequenzunterschiede auf. Im Vergleich zu Amylocyclicin A sind diese bei den Positionen 21 (A→T, *Bacillus coagulans*), 25 (I→V, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*), 34 (I→V, *Bacillus coagulans*), 41 (I→V, *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*), 45 (I→V, *Bacillus coagulans* 36D1) und 51 (T→S, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*; T→A, *Bacillus coagulans*) zu finden.

4.2 Plantazolicin

4.2.1 Identifizierung einer Substanz mit der Masse 1336 $[M+H]^+$

In MALDI-TOF-MS- und HPLC-ESI-MS- Spektren des Zelloberflächenextraktes und methanolischen Extrakten des gefriergetrockneten Kulturoberstandes von FZB42 war im Bereich der kleinen Sekundärmetabolite, wie Polyketide oder Lipopeptide, eine Substanz mit der Masse 1336 $[M+H]^+$ (cpd1335) auffällig (Abbildung 31).

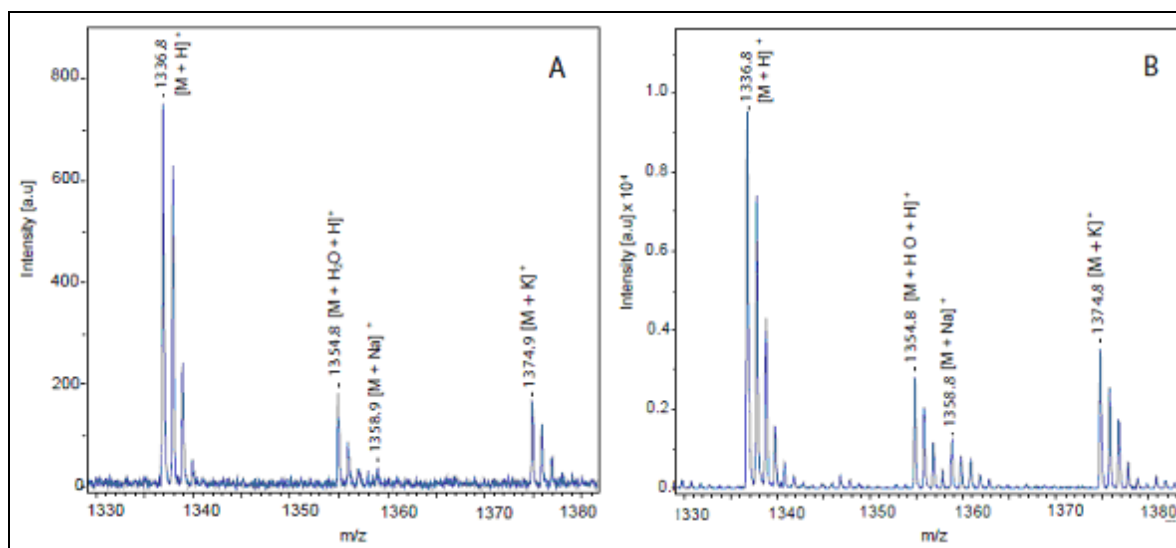


Abbildung 31 MALDI-TOF-MS von *B. amyloliquefaciens* Zelloberflächenextrakten. Die Peaks bei $m/z=1336.8 [M+H]^+$, $1354.8 [M+H_2O+H]^+$, $1358.8 [M+Na]^+$, und $1374.8 [M+K]^+$ zeigen die Präsenz von cpd1335 im Wildtyp (A) und in der *sfp,bac* Mutante RS6 (B)

Während der Identifizierung der Substanz, die gegen *B. subtilis* HB0042 wirksam ist, wurde in einer SDS-Page eine antibakterielle Substanz mit Aktivität gegen *Bacillus subtilis* gefunden, die gemessen am Marker zwischen 1 und 3 kDa groß ist (Abbildung 32A).

Die Substanz war jedoch so gering konzentriert, dass sie im Gel nicht mit Coomassie angefärbt werden konnte, oder aber es handelte sich nicht um ein Peptid und konnte aus diesem Grund nicht angefärbt werden. Im konzentrierten Oberflächenextrakt von Zellen aus der stationären Phase konnte eine Substanz angereichert werden, die sich im SDS-Gel mit Coomassie anfärben ließ und zu der erwarteten Größe von 1-3 kDa passte (Abbildung 32B).

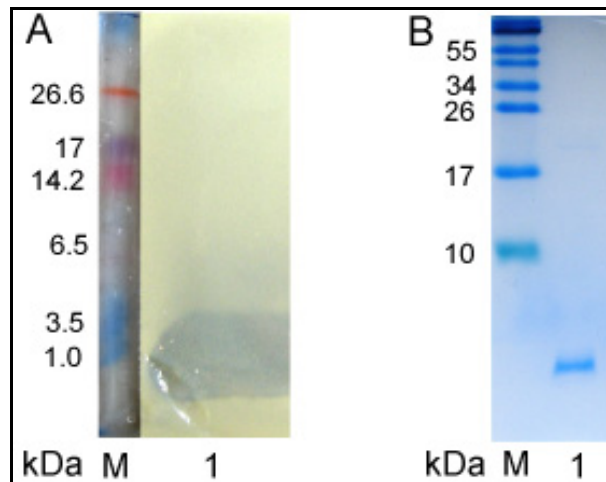


Abbildung 32 20% Tris-Glycin-SDS-Page und Bioassay auf *B. subtilis* HB0042; (A) Bioassay, M: Color Marker, 1: 20µl Kulturüberstand vom Stamm RS6; (B) Coomassiefärbung, M: Marker, 1: RS6 Zelloberflächenextrakt 2µl,

Die entsprechende Bande im Gel aus Abbildung 32B wurde ausgeschnitten und mit 50 µl 70 % Acetonitril : 30 % 0,1 % ige Ameisensäure für 24 h extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt mit MALDI-TOF-MS (90) vermessen. Dabei ergab sich eine Masse von 1354 $[M+H]^+$ für diese Substanz (Abbildung 33).

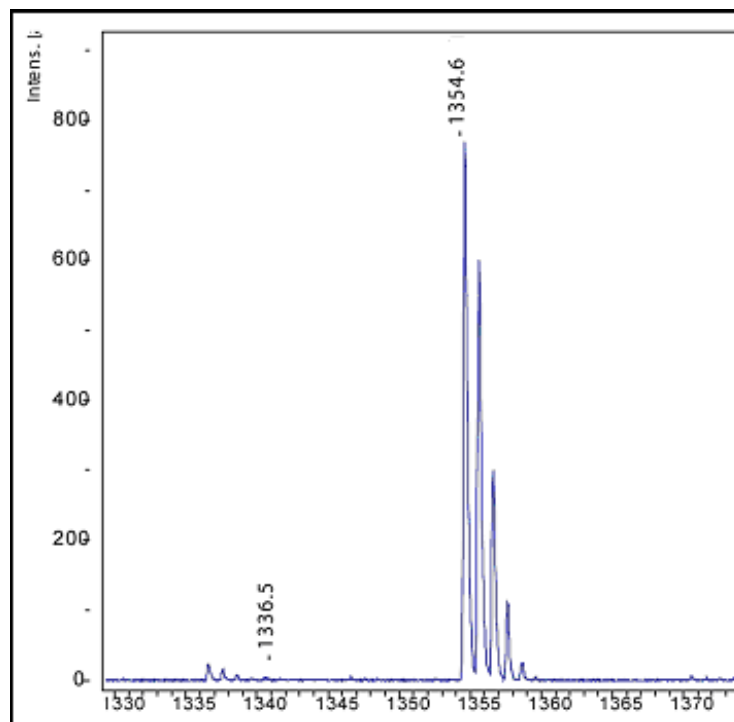


Abbildung 33 MALDI-TOF-MS des Extraktes der Gelbande bei 1-3 kDa aus Abbildung 32B

Bei der im Gel mit Coomassie angefärbten Substanz handelte es sich also um eine Substanz mit der Masse $1336 [M+H]^+$ (cpd1335), die als hydratisierte Form (+18) mit der Masse $1354 [M+H]^+$ auftritt.

Dieses vermutliche Hydratations-Produkt dominiert in den Messungen nach längerer Arbeit mit der Substanz, wie nach Aufreinigungsschritten oder Durchlaufen eines SDS-Gels.

Die Färbung mit Coomassie ist relativ schwach. Eine bessere Visualisierung konnte mit Schiff's Reagenz nach einer Oxidation mit Perjodsäure erreicht werden (Abbildungen 34 und 35). Perjodsäure oxidiert Alkohole zu Aldehyden, die dann mit Schiff's Reagenz reagieren.

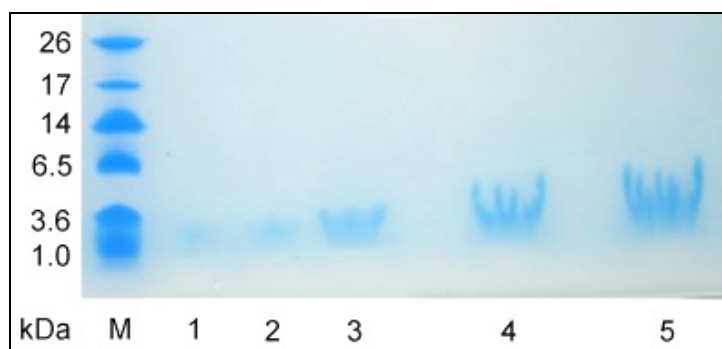


Abbildung 34 18% Tris-Tricine-SDS-Page mit RSpMarA2 Oberflächenextrakt und Färbung mit Coomassie EZBlue; M: Marker, 1: 1 μ l, 2: 2 μ l, 3: 5 μ l, 4: 10 μ l, 5: 20 μ l

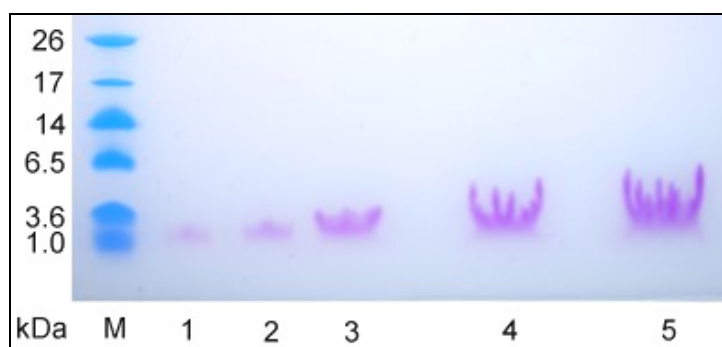


Abbildung 35 Doppelfärbung des Gels aus Abbildung 27 mit Coomassie und Schiff's Reagenz; M: Marker, 1: 1 μ l, 2: 2 μ l, 3: 5 μ l, 4: 10 μ l, 5: 20 μ l

4.2.2 Detektion von Thiopeptidsynthesegenen im Genom von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42

Da kein Biosynthesecluster für die Synthese einer ribosomal hergestellten antibakteriellen Substanz im FZB42-Genom bekannt war, wurde cpd1335 biochemisch untersucht, um Hinweise auf sein Natur zu erhalten.

In diesen Untersuchungen und LC-ESI-MSMS-Messungen von cpd1335 stellte sich heraus, dass die Substanz in Chloroform löslich ist, jedoch unlöslich in Wasser in höheren Konzentrationen, und sie vermutlich starke Modifizierungen aufweist.

Anhand aller Untersuchungsergebnisse wurde vermutet, dass es sich bei cpd1335 um ein hydrophobes, stark modifiziertes Peptid ribosomalen Ursprungs handelt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Literaturrecherche nach kleinen, stark modifizierten, Chloroform-löslichen, antibakteriellen Peptiden aus grampositiven Bakterien durchgeführt.

Als Resultat dessen stellte sich heraus, dass die Gruppe der Thiopeptide eine erhebliche Ähnlichkeit in den untersuchten Merkmalen aufweist (43, 56, 63, 93). Weiterhin wurde festgestellt, dass Orthologe einiger Thiopeptidbiosynthese-Gene im *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-Genom vorhanden sind und somit cpd1335 durch einen ähnlichen Mechanismus hergestellt werden könnte.

In eines dieser orthologen Gene (*RBAM_007480*) wurde eine Spectinomycin-Resistenzkassette eingefügt. Die resultierende Mutante RS26 kann kein cpd1335 mehr herstellen, wie durch HPLC-ESI-MS-Messungen gezeigt wurde (Abbildung 38A).

Zusätzlich zu der Ähnlichkeit zu Thiopeptidbiosyntheseproteinen, zeigte sich durch die Sequenzvergleiche mit Protein-BLAST (2) und ClustalW (87), dass die cpd1335-Biosyntheseproteine von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 eine Ähnlichkeit zu den Streptolysin S-Biosyntheseproteinen von *Streptococcus pyogenes* (53) aufweisen. Streptolysin S ist ein zytolytisches Toxin aus *Streptococcus pyogenes* (62).

Es wird, wie die Thiopeptide auch, durch ein Thiazol/Oxazol-modifiziertes Microcin (TOMM)-Biosynthesecluster hergestellt (53).

Die SagB-Dehydrogenase entspricht dabei *RBAM_007480* (20% identisch, 53% ähnlich).

Die Cyclodehydratase, SagC, entspricht *RBAM_007460* (13% identisch, 50% ähnlich) und das Docking Protein, SagD, ist ortholog zu *RBAM_007470* (19% identisch, 58% ähnlich).

Weitere Ähnlichkeiten zum Streptolysin-Cluster zeigen *RBAM_007490* (SagE, CAAX-Protease), *RBAM_007430* (SagG, ABC-Transporter), und *RBAM_007420* (SagI, ABC-Transporter) (19, 53).

Obwohl sich das Streptolysin S- Cluster und das cpd1335-Cluster ähneln, zeigte sich bezüglich der hämolytischen Aktivität von RSpMarA2 (cpd1335-Überproduzent) und RS26 (cpd1335-Mutante) kein Unterschied, was darauf hinweist, dass cpd1335 keine zytotoxische Funktion hat (Abbildung 36).



Abbildung 36 Test auf hämolytische Aktivität von cpd1335 auf Blutagarplatten mit 100µl konzentriertem Zelloberflächenextrakt; links von RSpMarA2 (+cpd1335), rechts von RS26 (-cpd1335)

Cpd1335 benötigt also eine Dehydrogenase des TOMM-Typs für seine Produktion. *RBAM_007480*, ein *sagB*-ähnliches Gen, befindet sich in einem zwölf Gene umfassenden Cluster, das für die Biosynthese, den Export und die Immunität dieses stark modifizierten, hydrophoben, natürlichen Produkts cpd1335 verantwortlich ist.

Alle TOMM-Produkte besitzen von Cystein und Serin/Threonin ausgehende “Azol”-Ringe in ihrem ribosomal synthetisierten Peptidrückgrat. Da das cpd1335-Biosynthesecoluster nur in pflanzenassoziierten-*amyloliquefaciens*-Stämmen gefunden wurde und das Produkt im ursprünglichen Sinne ein Bacteriocin ist, wurde die Substanz cpd1335 “**Plantazolicin**” (Pzn) benannt.

4.2.3 Funktionelle Analyse des Plantazolicin-Biosynthesecolusters

Das 9892 bp lange Pzn-Cluster um *RBAM_007480* umfasst zwölf Gene (Abbildung 37 und Tabelle 16). Aufgrund der Ähnlichkeit zum Streptolysin-Cluster wurde dessen Nomenklatur für die assoziierten Gene des Plantazolicin-Clusters übernommen.

Präkursor-Gen. Wie in vielen anderen TOMM-Clustern ist das Protoxin nicht als ORF im Genom annotiert (gb CP000560.1). Dieses Gen wurde durch manuelle Suche zwischen *pznI* und *pznJ* gefunden. Es besitzt eine gute Shine-Dalgarno Sequenz (AGGAGG) 8 bp vor dem Startkodon (80).

PznA besteht aus 41 Aminosäuren und besitzt in der C-terminalen Region (Kern-Peptid (71)) auffällig viele Aminosäuren, die zu Azol-Ringen modifiziert werden könnten (2 Cys, 4 Thr, 4 Ser). Dies ist ein klarer Hinweis auf die Funktion als Peptid-Präkursor. Der Nachweis für die Funktion als Protoxin besteht im Verlust der Produktion von Plantazolicin in der *pznA*-Mutante RS32 (Abbildung 38A).

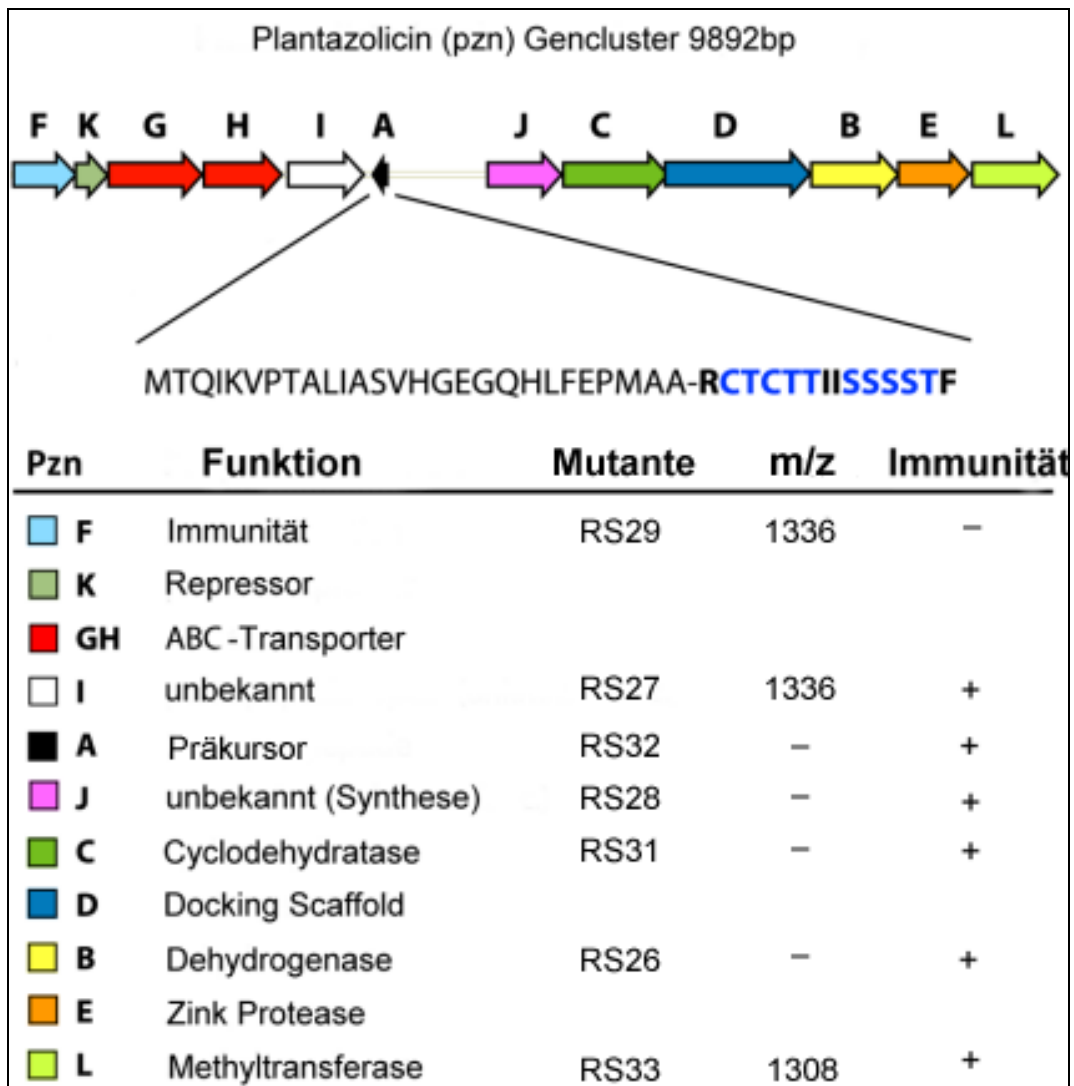


Abbildung 37 Plantazolicin Gencluster; Funktionen der Gene und Einfluss von Mutationen auf die Synthese von Pzn und Immunität gegenüber Pzn. Präkursoramino-säuresequenz: blau markierte Aminosäuren: mögliche (Methyl)Thiazol- und Oxazol-Ringe aus Serin, Threonin und Cystein, - vermutliche Peptidaseschnittstelle.

Operonstruktur und Regulation der Transkription. Das Pzn-Cluster ist in drei Sektionen unterteilt, wobei jede Sektion eine eigene Promotorregion (stromaufwärts von *pznF*, *pznA* und *pznJ*) besitzt (80). Das erste Operon besteht aus den fünf Genen *pznF*, *K*, *G*, *H*, und *I*,

die in Immunität, Export und Regulation involviert sind, wobei sich *pznK* und *pznG* überlappen.

PznK (RBAM_007410) ist ein Homodimer-Repressor mit einer DNA-Bindedomäne von Transkriptionsregulatoren der GntR-Familie und reguliert vermutlich die Pzn-Synthese auf noch unbekannte Weise. Die monomeren Proteine der GntR-Familie besitzen zwei funktionelle Domänen. Am N-Terminus befindet sich eine kleine, hoch konservierte „winged helix-turn-helix“ (WHTH)-Bindedomäne und am C-Terminus eine Ligandenbindedomäne, die für die Bindung des Effektors und die Oligomerisierung verantwortlich ist. Außerdem besitzt PznK hohe Homologie zu den Transkriptionsregulatoren der ArsR Familie (5), einer Untergruppe der „winged helix-turn-helix“ (WHTH)-Transkriptionsregulatoren, die bei Anwesenheit von Metallionen von der DNA dissoziieren. Die Bindestellen der Mitglieder der GntR-Familie sind sehr unterschiedlich (75), so dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, wo genau PznK bindet.

Das zweite Operon (*pznJ,C,D,B,E,L*) beinhaltet die Gene, die für die Enzyme kodieren, die den inaktiven PznA-Präkursor in das reife, aktive Produkt umwandeln.

Enzymatische Bearbeitung von PznA. Die Enzyme für die Modifizierung und Bearbeitung von PznA sind im zweiten Operon (*pznJ,C,D,B,E,L*) des Pzn-Biosyntheseklusters kodiert.

Die Funktion des ersten Gens, *pznJ*, ist unbekannt. **PznJ** besitzt 29 % ige Identität mit einer putativen Hydroxylase aus einem ähnlichen Cluster von *Clavibacter michiganensis* ssp *sepedonicus*. Homologien zu anderen Hydroxylasen finden sich jedoch nicht. Weitere schwache Homologien zeigen sich zu Oxidoreduktasen und Proteinen der NmrA-Familie. NmrA ist ein negativer Transkriptionsregulator. In der NmrA-Familie befinden sich jedoch auch Dehydrogenasen/Reduktasen (84).

PznJ könnte für eine weitere, bisher unbekannte, Modifizierung notwendig sein. Die Mutante RS28, bei der *pznJ* durch ein Spectinomycinresistenzgen ersetzt wurde, stellt kein Plantazolicin mehr her (Abbildung 38A). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass PznJ eine wichtige Rolle in der Biosynthese einnimmt.

PznC entspricht der TOMM-Cyclodehydratase SagC aus *S. pyogenes*, die als trimere Komplex mit dem Docking-Protein **PznD** und der Dehydrogenase **PznB** (Methyl)Oxazol- und Thiazol-Ringe in das Peptidrückgrat des Protoxins einführt.

Die Mutante RS31, bei der das *pznC*-Gen unterbrochen ist, kann kein Plantazolicin mehr herstellen (Abbildung 38A).

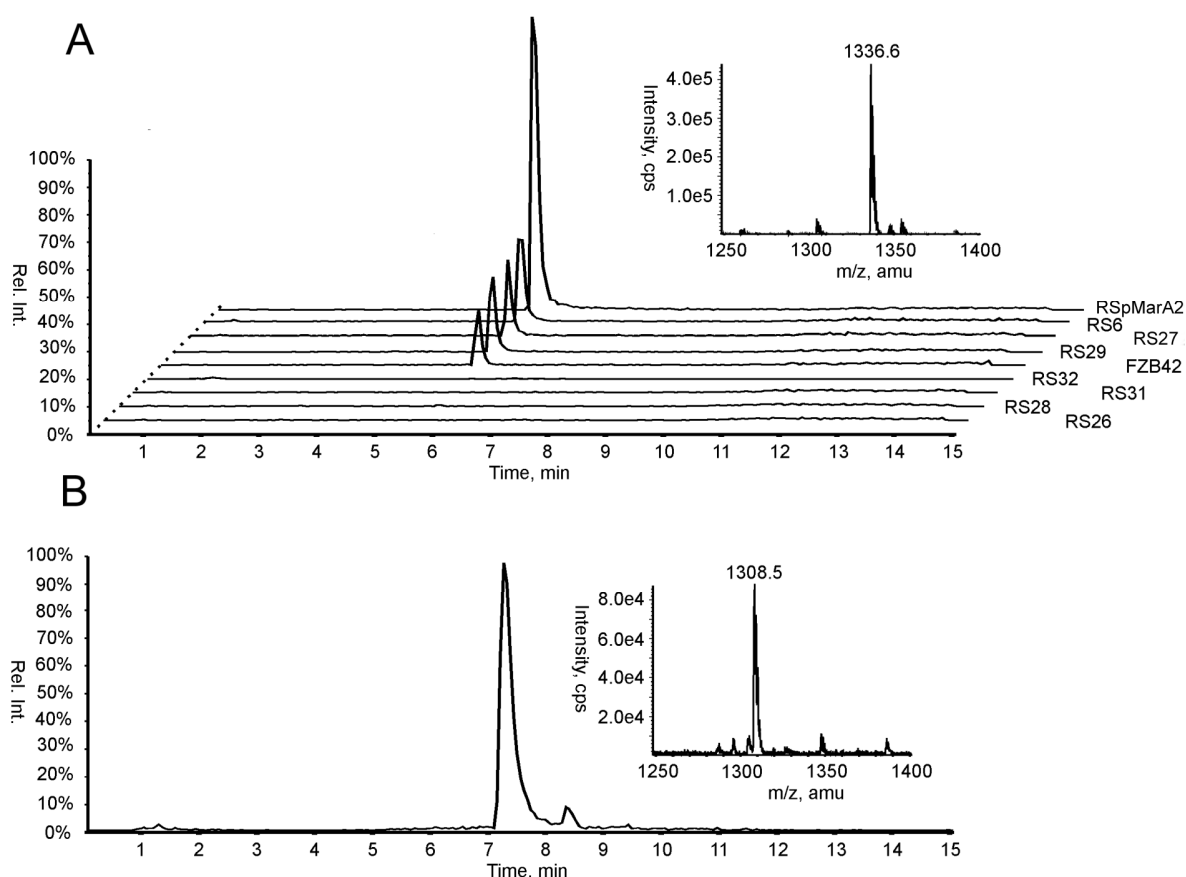


Abbildung 38 HPLC-ESI-MS-Messungen des Oberflächenextraktes, (A) der Plantazolicin Mutanten und der Überproduktionsmutante RSpMarA2, XIC 1336, (B) der Methyltransferase Mutante RS33, XIC 1308

PznE gehört zu der Familie der vermutlich membrangebundenen Caax-Metalloproteasen (73) und besitzt vier durch OCTOPUS (92) vorhergesagte Transmembrandomänen (Abbildung 39), ähnlich den Caax-Proteasen von *S. pyogenes*, *C. botulinum*, *S. aureus*, und *L. monocytogenes* (53). Dieses vermutlich Zink- abhängige Protein könnte als Leader-Peptidase fungieren und das PznA-Protoxin nach PMAA schneiden.

Bacteriocin-Leaderpeptide werden oft nach einem Doppel-Glycin geschnitten, wobei statt dessen aber auch andere kleine Aminosäuren wie Serin oder Alanin vorkommen (21, 71, 89).

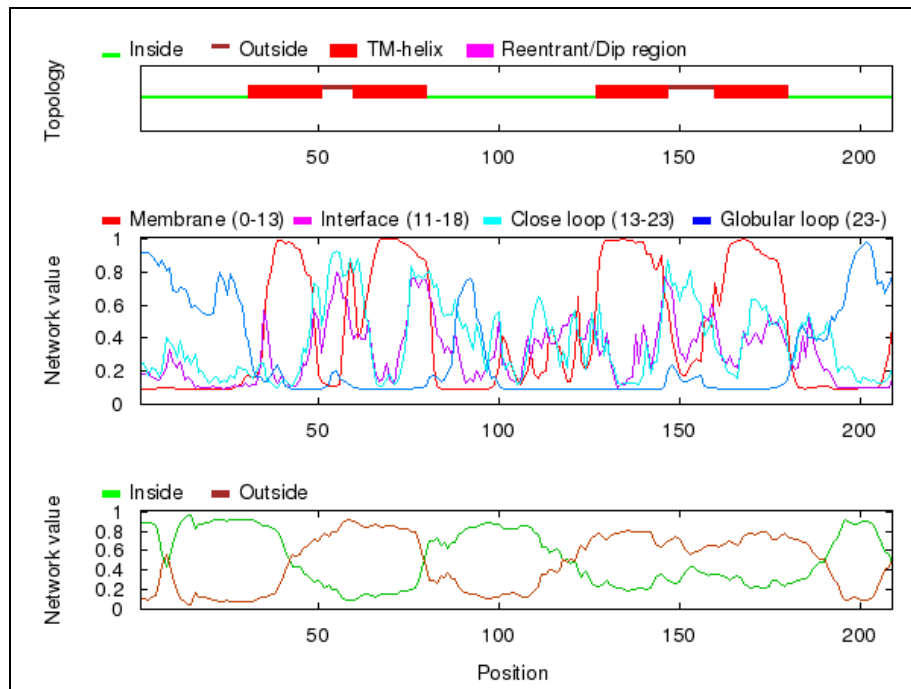


Abbildung 39 vier vorhergesagte Transmembranhelices für PznE nach Octopus (92)

PznL ist eine S-Adenosylmethionin- abhängige Methyltransferase (SAM oder AdoMet-MTase). Dies sind Enzyme, die S-Adenosyl-L-Methionin (SAM oder AdoMet) als Substrat für den Methyltransfer benutzen, wobei S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) entsteht. Der Ersatz des Methyltransferasegens durch ein Spectinomycinresistenzgen führte zu einem Produkt mit der Masse $1308 [M+H]^+$, das entspricht einem Verlust von 28 Da (Abbildung 38B).

Hieraus lässt sich ableiten, dass PznL für den Einbau von zwei Methylgruppen ($CH_3 = 15$ Da; $(2 \times 15) - 2H = 28$ Da) verantwortlich ist.

Produkt-Export und Immunität. Wie schon oben beschrieben sind **PznG** (RBAM_007420) und **PznH** (RBAM_007430) homolog zu ABC-Transportern der TOMM-Gruppe, wobei PznG für die ATP-Bindung verantwortlich ist und PznH, mit sechs vorhergesagten Transmembranhelices (Abbildung 40), die Permease-Aktivität ausübt. ABC-Transporter sind bekannte Bestandteile der TOMM-Cluster (53).

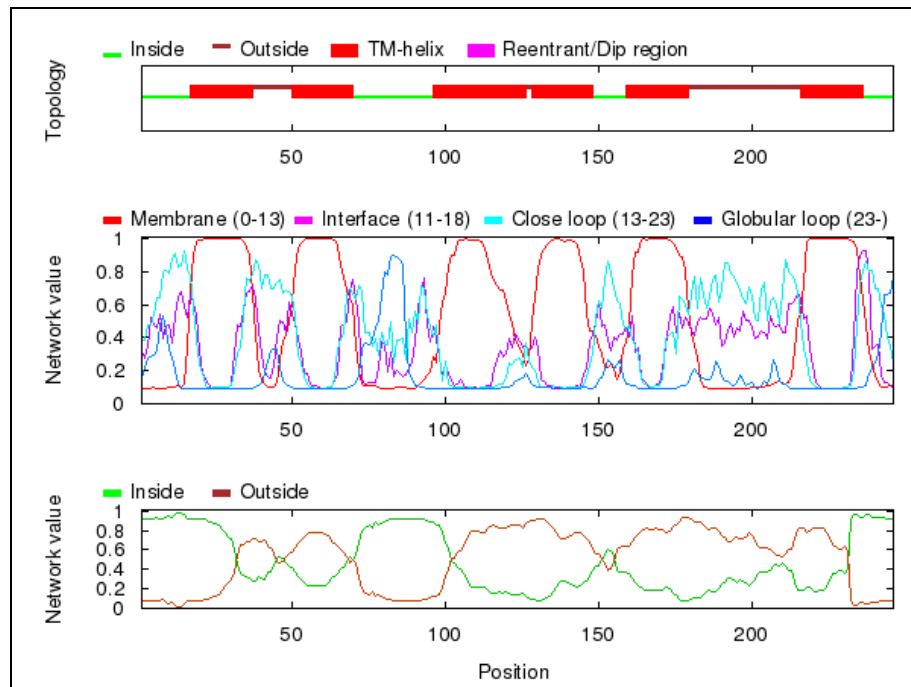


Abbildung 40 sechs vorhergesagte Transmembranhelices für PznH nach Octopus (92)

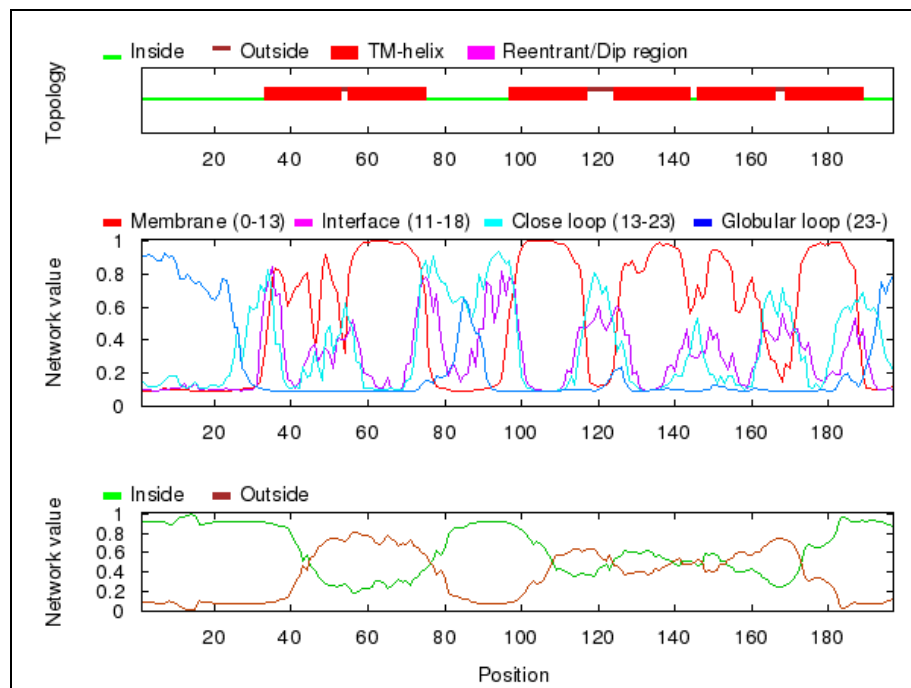


Abbildung 41 sechs vorhergesagte Transmembranhelices für PznF nach Octopus (92)

PznF ist ein putatives Membranprotein mit sechs vorhergesagten Transmembranhelices (Abbildung 41). **PznI** ist ein Pentapeptid-Repeat-Protein. Andere Mitglieder der Pentapeptid-Repeat-Familie spielen eine wichtige Signalrolle über Protein-Protein-Interaktionen (91) und können Resistenz gegenüber Quinolon-Antibiotika verleihen (76).

PznI hat geringe Homologie zu einem McbG-ähnlichen Protein aus *Erwinia billingiae* Eb661 (25 %). McbG ist das Microcin B17 Immunitätsprotein.

Eines oder beide Proteine könnten in die Selbst-Immunität gegenüber Plantazolicin involviert sein (53). Um dies zu untersuchen, wurden beide Gene jeweils durch ein Spectinomycinresistenzgen ersetzt. Beide Mutantenstämme konnten weiterhin Plantazolicin bilden (Abbildung 38A), jedoch gab es Unterschiede in Bezug auf das Wachstum.

Die *pznI*-Mutante RS27 wächst normal auf Agarplatten und in flüssigem LB-Medium, wohingegen die *pznF*-Mutante RS29 im Gegensatz zu RS6 und den anderen Mutanten nach Beginn der transienten Phase in flüssigem LB-Medium lysiert (Abbildung 42). Das Membranprotein PznF bietet somit Immunität gegenüber Plantazolicin.

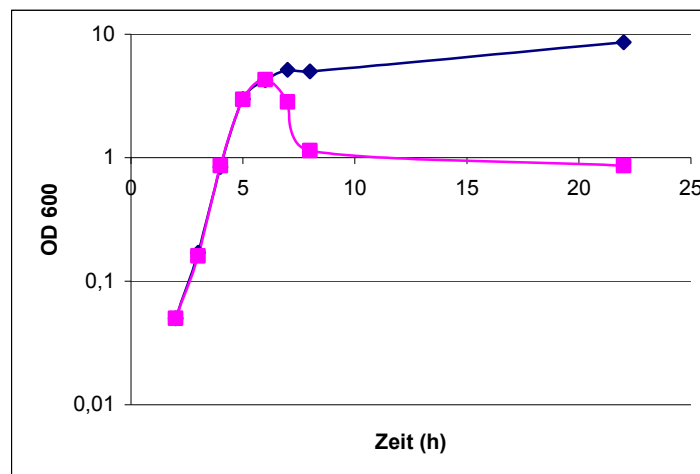


Abbildung 42 Wachstumskurven von RS6 (blau) und RS29 (pink) in flüssigem LB Medium

Da FZB42 ein Immunitätsgen besitzt, wurde vermutet, dass Pzn eine antibakterielle Aktivität besitzt. Deswegen wurden diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt.

Plantazolicin zeigt eine antibakterielle Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien, jedoch nicht gegenüber Gramnegativen (Tabelle 15). Diese Aktivität zeigte sich im Biotest mit dem konzentrierten Oberflächenextrakt des Pzn-Produzenten RSpMarA2 im Vergleich mit der Pzn-Mutante RS26 (Abbildung 43) und der gereinigten Substanz (Abbildungen 44).

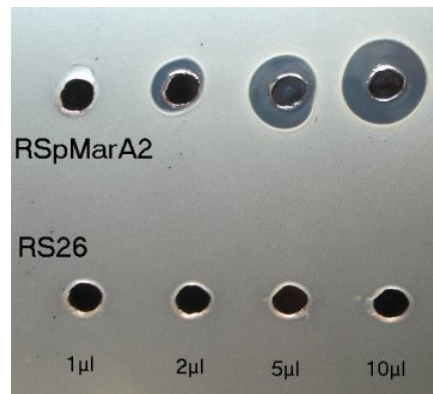


Abbildung 43 Bioassay mit dem Zelloberflächenextrakt von RSpMarA2 und RS26 auf *B. subtilis* HB0042

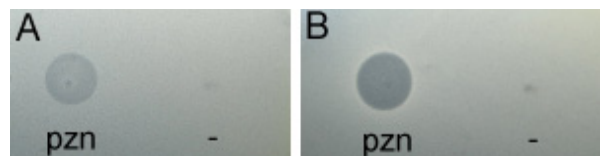


Abbildung 44 Bioassay mit dem gereinigten Plantazolin (pzn) und der Negativkontrolle H₂O (-) auf *Bacillus subtilis* HB0042; (A) 5mg/ml (B) 100mg/ml

Tabelle 15 Sensitivität der Indikatorbakterien gegenüber Plantazolin

Indikatorstamm	Ergebnis ^a
<i>Bacillus brevis</i> ATCC8246	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	+
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC9789	+
<i>Micrococcus luteus</i>	+
<i>Bacillus pumilus</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i> CU1065	+
<i>Bacillus subtilis</i> HB0042	++
<i>Bacillus sphaericus</i>	+
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-
<i>Paenibacillus granivorans</i>	+
<i>Bacillus megaterium</i> 7A1	++
<i>Arthrobacter</i> spez.	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>E. coli</i> K12	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	-
<i>Pseudomonas</i>	-
<i>Erwinia caratovora</i>	-

^a Grad der Hemmung im Bioassay: ++: Hemmung; +: schwache Hemmung; -: keine Hemmung

Tabelle 16 Gene des Plantazolicin-Clusters

Gen	Name	AS	pI	Homologie	Funktion
<i>RBAM_007400</i>	<i>pznF</i>	197	9,26	Putatives Membran-Protein (6 TM)	Immunität
<i>RBAM_007410</i>	<i>pznK</i>	103	9,19	Regulator, ArsR	Repressor
<i>RBAM_007420</i>	<i>pznG</i>	296	6,73	Putativer ABC-Transporter, ATP-Bindung	ABC-Transporter
<i>RBAM_007430</i>	<i>pznH</i>	246	8,95	Putative ABC-Transporter Permease (6 TM)	ABC-Transporter
<i>RBAM_007440</i>	<i>pznI</i>	240	8,52	Konserviertes hypothetisches Protein, Pentapeptid-Wiederholungen enthaltendes Protein	Unbekannt
	<i>pznA</i>	41* ¹ /14* ²	6,69* ¹ / 8,07* ²	Keine Homologie	Protoxin
<i>RBAM_007450</i>	<i>pznJ</i>	234	4,65	Konserviertes hypothetisches Protein	Unbekannt
<i>RBAM_007460</i>	<i>pznC</i>	330	5,63	Konserviertes hypothetisches Protein	Cyclodehydratase
<i>RBAM_007470</i>	<i>pznD</i>	447	5,60	Konserviertes hypothetisches Protein	„Docking Scaffold“
<i>RBAM_007480</i>	<i>pznB</i>	269	5,67	SagB-Typ Dehydrogenase Domän-Protein	Dehydrogenase
<i>RBAM_007490</i>	<i>pznE</i>	209	9,39	Caax-Aminoprotease-Familie (4 TM)	Zink-Protease
<i>RBAM_007500</i>	<i>pznL</i>	270	6,66	Methyltransferase Domän-Familie	Methyltransferase

*¹ mit Leader-Peptid *² ohne Leader-Peptid, ohne Modifikationen; TM: Transmembranhelices (nach Octopus (92))

Die *degU*-Mutante RSpMarA2 stellt ein Vielfaches der Menge an Plantazolicin als der Ausgangsstamm RS6 her (Abbildung 38A). Eine negative Regulation durch DegU war deshalb zu vermuten.

Vor dem Biosynthese-Operon (*pznJ,C,D,B,E,L*) und dem Protoxin-Gen *pznA* gibt es jeweils durch DBTBS (83) (threshold: p-value 0,01-0,1) vorausgesagte SigA-Bindestellen, sowie putative DegU-Bindestellen (Abbildungen 45 und 46).

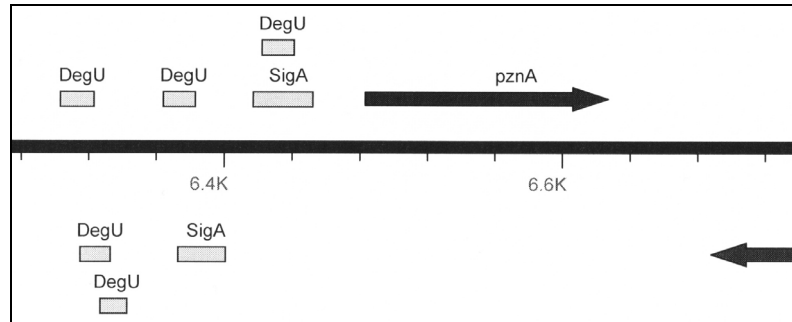


Abbildung 45 Putative SigA- und DegU- Bindestellen im Bereich von *pznA*

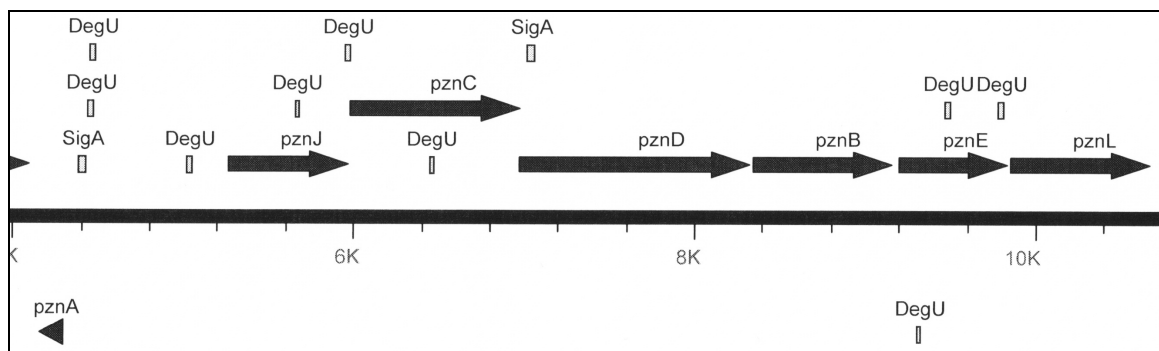


Abbildung 46 Putative SigA- und DegU- Bindestellen im Bereich von *pznJ, C, D, B, E, L*

Eine negative Regulation der Biosynthese durch DegU ist somit theoretisch möglich.

In der mutmaßlichen Promotorregion des Export- und Immunitätsoperons (*pznF, K, G, H, I*) befindet sich eine putative SigA-Bindestelle, jedoch keine vorhergesagten DegU-Bindestellen (Abbildung 47). Dadurch wäre die Immunität und der Export vor der Synthese von Plantazolicin sichergestellt.

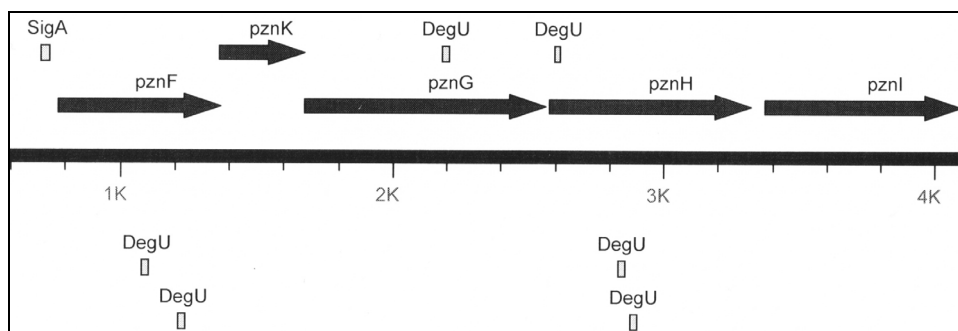


Abbildung 47 Putative SigA- und DegU- Bindestellen im Bereich von *pznF, K, G, H, I*

Der putative Repressor PznK wird eine Funktion in der Regulation der Synthese von Plantazolicin haben. Dessen Bindestellen können jedoch nicht vorhergesagt werden, da die Mitglieder der GntR-Familie keine einheitliche Erkennungssequenz besitzen (75).

Eine komplexe Regulation, mit PznK und DegU als Repressoren, sowie möglicherweise weiterer Faktoren, ist zu vermuten.

4.3 Hinweise auf weitere mögliche Bacteriocine

Neben Amylocyclicin A und Plantazolicin gab es anhand von Aktivitätstests und MALDI-TOF-Massenspektren Hinweise auf weitere putative Bacteriocine.

Die Mutanten des Amylocyclicin A-Genclusters zeigten im Aktivitätstest mit *B. subtilis* **HB0042** als Indikatorstamm eine Aktivität, die geringer ist als die des Ausgangsstammes RS6 (Abbildung 48). Das heißt, es gibt neben Amylocyclicin A mindestens eine zweite Substanz, die gegen den *B. subtilis*-Stamm wirksam ist. Diese Substanz scheint DegU-abhängig zu sein, denn die *degU*-Mutante RSpMarA2 zeigt im Aktivitätstest keine Aktivität mehr. Um Plantazolicin kann es sich bei der zweiten Substanz nicht handeln, da diese Substanz in der *degU*-Mutante überproduziert wird. Sie scheint später als Amylocyclicin A gebildet zu werden, da in Aktivitätstests mit dem Überstand vom Ende der logarithmischen Phase keine weitere Aktivität der Amylocyclicin A-Mutanten RS17, RS18 und RS19 sichtbar wurde (Abbildung 15).



Abbildung 48 Picktest mit den Amylocyclicin A-Clustermutanten und der *degU*-Mutante RSpMarA2 auf *Bacillus subtilis* HB0042; die Acn-Mutante RS17 besitzt noch Aktivität, die Pzn-Überproduktionsmutante nicht

In Aktivitätstests zeigte sich weiterhin eine starke Aktivität gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Abbildung 49). Diese Aktivität ist auch in den Mutanten von

Amylocyclicin A (RS17) und Plantazolicin (RS26) vorhanden, so dass es sich um eine bis jetzt unbekannte Substanz handeln muss.

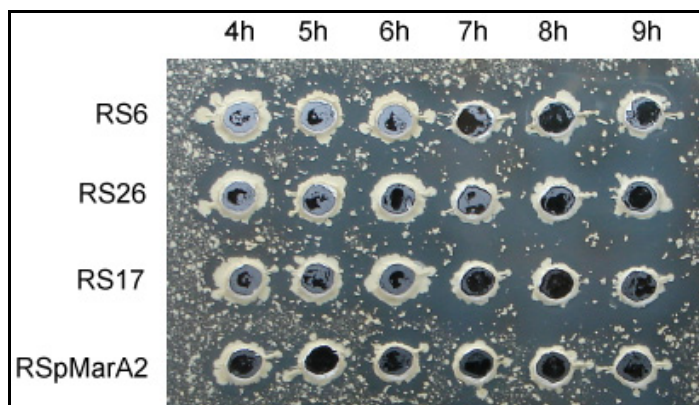


Abbildung 49 Bioassay mit *Streptomyces viridochromogenes*; sowohl RS6 als auch die Acn- und Pzn-Mutanten RS17 und RS26 besitzen eine antibakterielle Aktivität gegenüber *Streptomyces*, diese Aktivität tritt schon in der log-Phase auf (4-9h)

In der stationären Phase bildet der *Bacillus amyloliquefaciens*-Stamm RS6 eine Substanz, die gegen *Paenibacillus validus* wirksam ist.

Die Mutanten RS17 und RS26 besitzen ebenfalls Aktivität, so dass die aktiven Substanz weder Plantazolicin noch Amylocyclicin A sein kann (Abbildungen 50 und 51).

Die Aktivität war am Ende der logarithmischen Phase noch nicht vorhanden (Abbildung 50A rechts) und die Wirkung stieg nach 36h noch weiter an (Abbildung 50 B-C, Abbildung 51 A-B).



Abbildung 50 Bioassay mit Kulturüberstand von RS6 (+acn, links) und RS17 (-acn, rechts) auf *Paenibacillus validus*, A: 6,5h, B: 36h, C: 48h

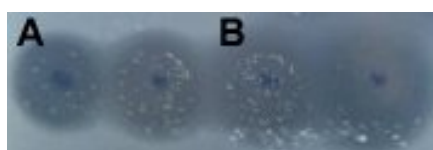


Abbildung 51 Bioassay mit Kulturüberstand von RS6 (+pzn, links) und RS26 (-pzn, rechts) auf *Paenibacillus validus*, A: 36h, B: 48h

MALDI-TOF-Massenspektren der in Methanol bzw. Wasser aufgenommenen Ammoniumsulfatfällungen des Überstandes von Kulturen von RS6 und Acn-Mutantenstämmen weisen Massenpeaks bei m/z 5199, 5389, 5726 und 7298 auf (Abbildungen 52 und 53).

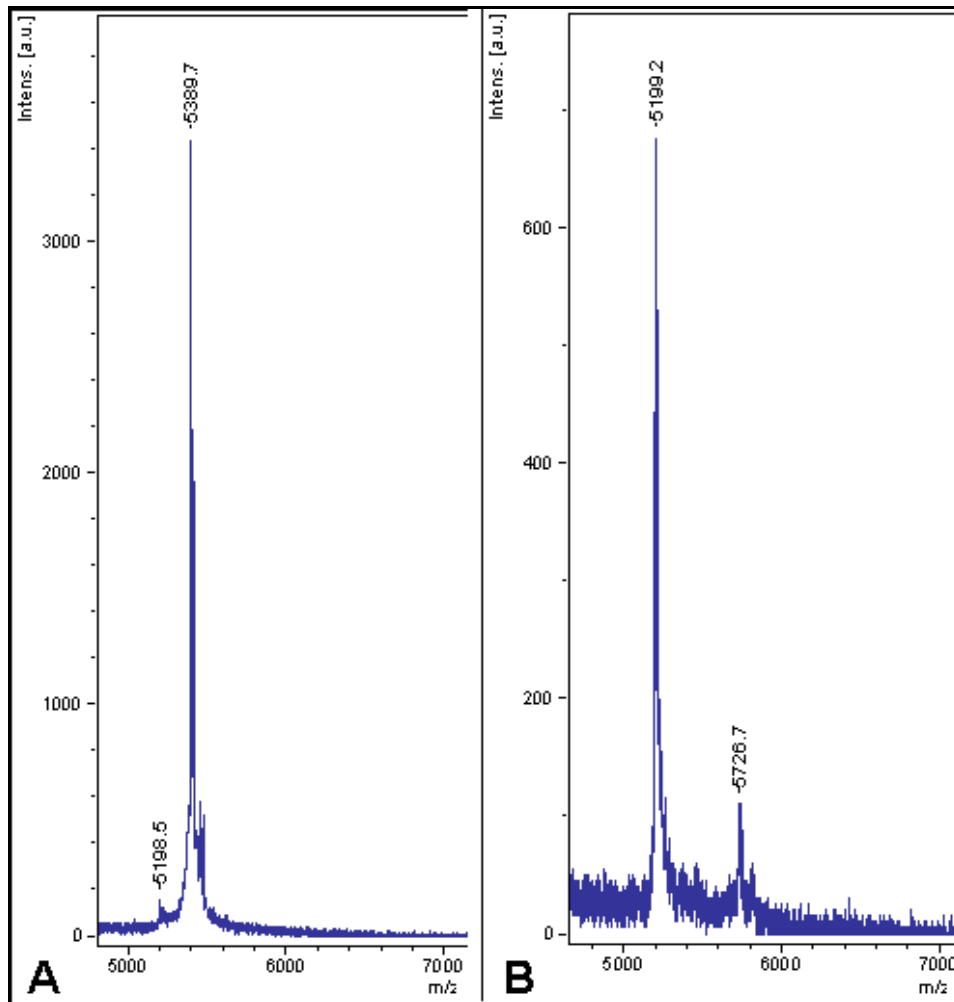


Abbildung 52 MALDI-TOF-MS detektierte Massenpeaks bei m/z 5199, 5389 und 5726 in den methanolischen Extrakten der Ammoniumsulfatfällung des Überstandes einer Kultur von (A) RS18 und (B) RSpMarA2

Die Größe der Substanzen und ihre Fällbarkeit mit Ammoniumsulfat legt die Vermutung nahe, dass es sich um Peptide handelt, die für die noch unbekannten antibakteriellen Aktivitäten gegen *B. subtilis* HB0042, *Streptomyces* und *Paenibacillus validus* verantwortlich sind.

Die Substanz mit der Masse 5389 $[M+H]^+$ ist DegU-abhängig, da diese Substanz in der *degU*-Mutante RSpMarA2 nicht vorhanden ist (52B).

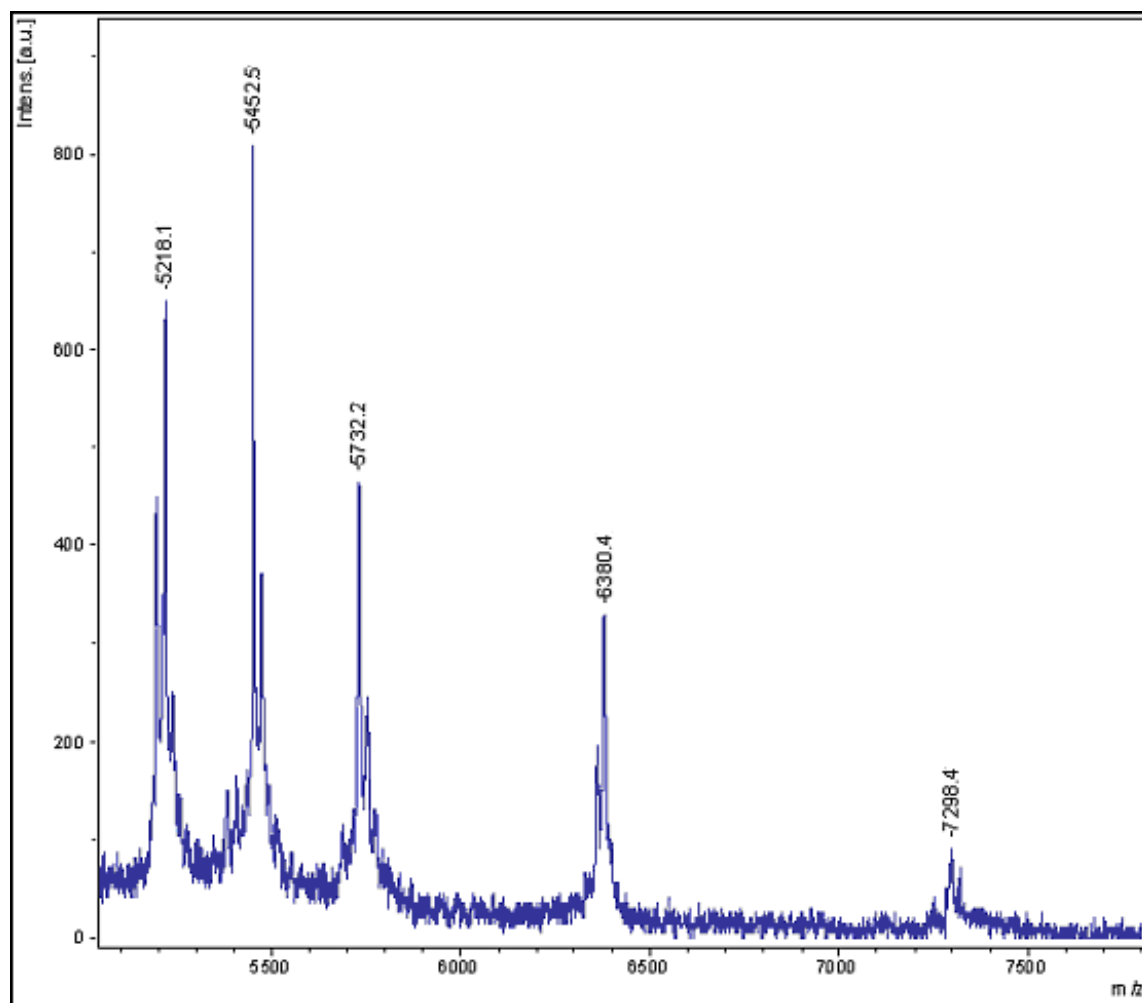


Abbildung 53 MALDI-TOF-MS des wässrigen Extraktes der Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstandes von RS6

Eine **SDS-Page** des konzentrierten Zelloberflächenextraktes der Pzn-Mutante RS26 ergab eine Bande, einer mit Coomassie und Schiff's Reagenz angefärbten Substanz, die wie Plantazolicin zwischen 1.0 und 3.5 kDa lokalisiert ist (Abbildung 54).

In HPLC-ESI-MS Messungen des Oberflächenextraktes der Plantazolicin-Mutante RS26 war die Masse 1508 $[M+H]^+$ auffällig.

Diese Substanz scheint Plantazolicin zu ähneln. Beide Substanzen werden während der stationären Phase gebildet und scheinen in etwa die gleiche Größe zu haben.

Weiterhin lassen sich beide Substanzen sowohl mit Coomassie als auch mit Schiff's Reagenz anfärben, wobei sich Plantazolicin besser mit Coomassie und die unbekannte Substanz besser mit Schiff's Reagenz anfärben läßt (Abbildung 54 A und B).

In wässriger Lösung des konzentrierten Oberflächenextraktes von RS26 (-pzn) bildet sich eine Art Gel, was auf einen stark hydrophoben Charakter der Substanz hinweist.

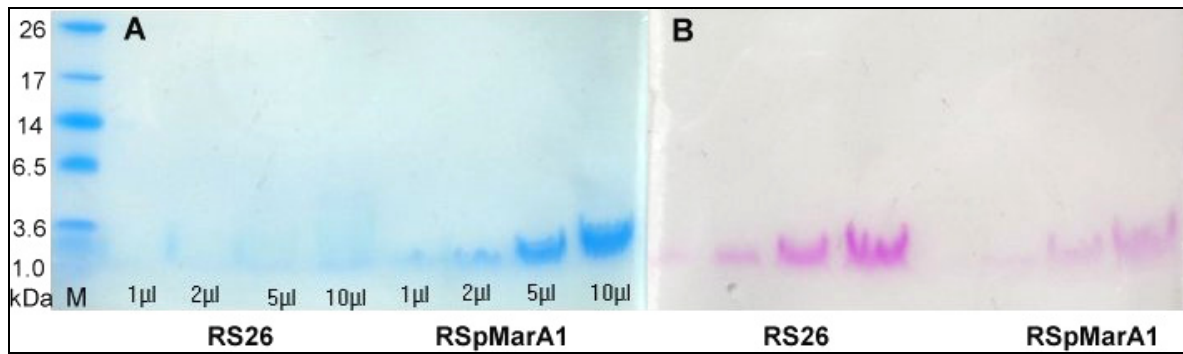


Abbildung 54 16,5% Tris-Tricine-SDS-Page mit dem konzentrierten Zelloberflächenextrakt von RS26 (-pzn) und RSpMarA1 (+pzn); M: Marker; A: Coomassie EZBlue Färbung; B: Färbung mit Schiff's Reagenz

Aufgrund der biochemischen Untersuchungen und den LC-ESI-MSMS Ergebnissen ist eine hydrophobes, stark modifiziertes Peptid ribosomalen Ursprungs zu vermuten.

Ein Gencluster, ähnlich dem für die Biosynthese von Plantazolicin, konnte jedoch nicht im FZB42-Genom gefunden werden.

5 Diskussion

Die Synthese von antimikrobiellen Substanzen ist sowohl unter grampositiven, als auch unter gramnegativen Bakterien, weit verbreitet.

B. amyloliquefaciens FZB42 ist ein pflanzenassoziiertes Bakterium und kann das Wachstum aktiv, zum Beispiel durch die Produktion von Auxin, fördern (33), sowie durch die Produktion von Sekundärmetaboliten phytopathogene Organismen hemmen (8-11).

Die Synthese kann nicht-ribosomal durch große Proteinkomplexe, wie Polyketidsynthasen (PKS) oder nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS), vollzogen werden.

Die Nutzung von 8,5% des Genoms für diese **nicht-ribosomale Synthese** spricht für die Notwendigkeit dieser energieaufwendigen Produktion, um sich im Lebensraum Boden eine Überlebensnische zu sichern und konkurrierende Mikroorganismen zu verdrängen.

Die Polyketide Bacillaene, Difficidin und Macrolactin wirken antibakteriell, Bacillomycin D und Fengycin decken das antifungale Spektrum ab.

Surfactin ist, neben Bacilysin, ein weiteres antibakterielles Produkt nicht-ribosomaler Synthese und spielt eine Rolle in der Biofilm-Bildung.

Die Gencluster für die Synthese von Fengycin, Surfactin, Bacillaene, Bacilysin und Bacillibactin sind auch in dem verwandten Modellstamm *Bacillus subtilis* 168 vorhanden. Diese Substanzen können jedoch bis auf Bacilysin nicht hergestellt werden, da das für die Synthese benötigte Gen *sfp* defekt ist. Im Gegensatz zu *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 fördert *Bacillus subtilis* 168 nicht das Pflanzenwachstum und gehört nicht zu den PGPR (Plant Growth Promotion) Bakterien.

Neben der Möglichkeit der nicht-ribosomalen Synthese von antimikrobiellen Substanzen besteht die Möglichkeit der **ribosomalen Synthese**. Diese Produkte werden meist zu der großen Gruppe der Bacteriocine gezählt.

Die ersten bekannten Vertreter waren die großen Colicine aus der Familie *Enterobacteriaceae*. Später folgten die von grampositiven Milchsäurebakterien produzierten Substanzen, die, wie z.B. Nisin, in der Lebensmittelindustrie zur Konservierung eingesetzt werden (36).

Aufgrund der steigenden Anzahl an multiresistenten Krankheitserregern wird an einem Einsatz von Bacteriocin-Vetretern in der Medizin geforscht. Ein aktuelles Beispiel für multiresistente Krankheitserreger ist das Auftreten des NDM-1 Gens bei Enterobakterien.

Das NDM-1 Gen kodiert für eine Metallo-Beta-Lactamase, die neben Penicillinen und Cephalosporinen auch die Notfall-Antibiotika Carbapeneme spalten kann (96). Dies zeigt, dass eine Entwicklung neuer Antibiotika bis zur Marktreife sehr dringend ist.

Viele Bacteriocine entfalten ihre Wirkung durch eine Zerstörung des Membranpotenzials, wogegen die Krankheitserreger keine klassischen Schutzmaßnahmen besitzen, wie eine Inaktivierung des Antibiotikums durch chemische Modifikation oder eine Anpassung der Zelle durch veränderte Zell-Bausteine.

Wie die meisten Bacteriocine aus grampositiven Bakterien ist auch Amylocyclicin A gegen grampositive Bakterien schon in sehr geringen Mengen aktiv.

Die genaue **Wirkungsweise** von Amylocyclicin A bleibt dabei aber noch zu untersuchen.

Es gehört zu den untereinander recht unhomologen zirkulären Bacteriocinen der Gruppe I, im Gegensatz zu den untereinander homologen zirkulären Bacteriocinen der Gruppe II.

Die Mitglieder beider Gruppen scheinen jedoch eine ähnliche globuläre 3D-Struktur mit einem hydrophoben Kern und positiven Ladungen auf ihrer Oberfläche zu besitzen (59). Die positiven Ladungen könnten eine Rolle bei der anfänglichen Interaktion mit den negativ geladenen Phospholipidgruppen in der zytoplasmatischen Membran von sensitiven Bakterien spielen.

Entsprechend der JPRED-Sekundärstrukturvorhersage besitzt auch Amylocyclicin A Helices wie CclA und Uberolysin, so dass für Amylocyclicin A wahrscheinlich auch von einer globulären **Sekundärstruktur** ausgegangen werden kann.

Carnocyclin A (CclA) aus *Carnobacterium maltaromaticum* gehört ebenfalls zu der Gruppe I der zirkulären Bacteriocine. Die Amidbindung zwischen N- und C-Terminus vermittelt Stabilität und strukturelle Integrität dieses 60 AS langen Peptides (60).

CclA interagiert mit Lipiddoppelschichten und formt Anionen-selektive Poren (27). Gassericin A und Reuterin 6 aus *Lactobacillus gasseri* und *L. reuteri* aus der Gruppe II der zirkulären Bacteriocine, verursachen einen Kaliumionenefflux aus Indikatorzellen und Liposomen (40). AS-48 verursacht nicht-selektive Poren in Lipiddoppelschichten, ähnlich Gassericin A und Reuterin 6, was zu einer freien Diffusion von Ionen und niedermolekularen Stoffen durch die Membran führt (25).

Aufgrund der vermutlich ähnlichen 3D-Struktur könnte auch Amylocyclicin A mit der Membran interagieren und einen Ionenfluss auslösen, was den Tod der sensitiven Zelle nach sich führen würde.

Enterocin AS-48 besteht aus fünf Helices mit einem hydrophoben Kern. Es liegt unter physiologischem pH-Wert vermutlich als wasserlösliches Dimer vor. Das Dimer interagiert mit der Membran und verändert dabei seine Konformation, was ein Eindringen in die Membran ermöglicht. CclA liegt hingegen unter physiologischen Bedingungen als Monomer vor (59). Ob auch Amylocyclicin A als Dimer auftreten kann ist noch nicht bekannt und bedarf kristallographischer Untersuchungen.

Gassericin A und Reuterin 6 besitzen eine identische Primärsequenz, jedoch einen unterschiedlichen Gehalt an D-Alanin (Gassericin A: 1, Reuterin 6: 2). Dies führt zu einer veränderten Charakteristik, wie Unterschiede in der Wirkungsweise und Sekundärstruktur (40). Ob Amylocyclicin A D-Aminosäuren besitzt, und inwiefern diese gegebenenfalls einen Einfluss auf die Aktivität haben, ist noch nicht bekannt.

Das weitgehend unmodifizierte Amylocyclicin A besitzt vermutlich eine kovalente Bindung von N- und C-Terminus, wie sie alle zirkulären Bacteriocine der Gruppen I und II aufweisen.

Eine direkte Bestätigung für diese Bindung kann jedoch noch nicht gegeben werden, da die Substanz nach der Extraktion extrem empfindlich zu sein scheint. Nach zwei Versuchen eines In-Gel Verdau mit Trypsin konnten keine ausreichenden Mengen von fragmentierten Peptidstücken gewonnen werden, die den Ringschluss belegen.

Jedoch ist die Homologie zu den zirkulären Bacteriocinen erwiesen, die alle eine kovalente Bindung von N- und C-Terminus aufweisen. Auch ist die Masse 18 Da kleiner als die des linearen theoretischen Peptids, so dass der Ringschluss indirekt bewiesen ist.

Die Cluster für die Synthese der zirkulären Peptide enthalten neben dem Peptidpräkursorgen einen ABC-Transporter, sowie ein oder mehrere Gene, die in die Zirkularisierung des Peptids involviert sind. Wie, und durch welche Genprodukte die Zirkularisierung vollzogen wird, ist noch unbekannt.

Zirkuläre Peptide kommen auch in Pflanzen und Tieren vor. Diese zeichnen sich jedoch durch mindestens eine Disulfidbrücke aus und sind kürzer, was zu einer Versteifung der Struktur führt und somit zu einer erweiterten Stabilisierung (63).

Für *Bacillus* sind bisher noch keine Vertreter der zirkulären Bacteriocine bekannt. Subtilosin A ist zwar zirkulär, jedoch relativ klein, anionisch und besitzt einzigartige Modifikationen und bildet deswegen eine eigene Gruppe (63) bzw. wird zu den Lantibiotika gezählt (58). Mit Amylocyclicin A konnte somit der erste Vertreter der zirkulären Bacteriocine aus der Gattung *Bacillus* identifiziert werden.

Von den stark modifizierten TOMM-Produkten sind noch nicht viele Vertreter charakterisiert worden. Sie scheinen jedoch entweder zytotoxische (z.B. Streptolysin S) oder antibakterielle Wirkung (Microcin B17) zu haben. Plantazolicin besitzt eine schwache antibakterielle Aktivität gegen grampositive Bakterien. Eine Funktion als Antibiotikum wird durch die Tatsache unterstützt, dass das PznF-Protein für die Immunität gegenüber Plantazolicin notwendig ist. Wahrscheinlich fungiert auch PznI als Immunitätsprotein aufgrund der Homologie zu Pentapeptid-Repeat-Proteinen, die eine wichtige Signalrolle über Protein-Protein- Interaktionen (91) spielen und Resistenz gegenüber Quinolon-Antibiotika verleihen können (76) bzw. zu einem McbG-ähnlichen Immunitätsprotein aus *Erwinia billingiae* Eb661 (25 %).

Da wahrscheinlich nur pflanzenassoziierte *amyloliquefaciens*-Stämme Plantazolicin produzieren, besteht die Möglichkeit, dass es sich um ein Signalmolekül für die Kommunikation mit der Pflanze handelt. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die Pflanzensymbionten *Pseudomonas putida* KT2440 und *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 ebenfalls eine bis jetzt unbekannte Substanz der TOMM Gruppe herstellen (53). Die entsprechenden Protoxine ähneln auf Aminosäureebene aber eher dem antibakteriellen MccB17 aus *E.coli*, so dass sie vermutlich eine antibakterielle Funktion, mit Angriff auf die DNA-Gyrase, ausüben (53).

Bacillus pumilus, der verschiedene antibakterielle und antifungale Produkte bildet, gehört auch zu der Gruppe der PGPR Bakterien (13), wie *B. amyloliquefaciens*, und stellt vermutlich Plantazolicin her. Die Thiazol/Oxazol-Synthetase-Proteine aus diesem Organismus zeigen eine hohe Übereinstimmung mit denen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 (PznB 77%; PznC 64%; PznD 82%). Zudem sind die Gene des *B. pumilus*-TOMM-Clusters genauso angeordnet wie die des FZB42-Clusters.

Das reife Peptid weist wahrscheinlich die gleiche Aminosäuresequenz wie Plantazolicin auf, in dem Leader-Peptid gibt es jedoch vier Aminosäureaustausche (Abbildung 55).

pznA_FZB42	MTQIKVPTALIASVHGEGQHLFEPMAARCTCTTISSSSTF
pznA_pumilus	MTKITIPTALSAKVHGEGQHLFEPMAARCTCTTISSSSTF
	:*.*:****.*****

Abbildung 55 Präkursor Sequenzvergleich von Plantazolicin aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 und dem putativen Plantazolicin aus *Bacillus pumilus*; CLUSTAL W (87), vermutliches Leader-Peptid in blau

Die Tatsache, dass die bekannten Produkte der TOMM-Cluster antibakteriell oder zytotoxisch sind und die Produkte der Pflanzensymbionten *Pseudomonas putida* KT2440 und *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 vermutlich antibakteriell wirken, spricht für eine antibakterielle Funktion von Plantazolicin.

Jedoch ist zu vermerken, dass die antibakterielle Aktivität mitunter nur ein Nebeneffekt der eigentlichen Funktion ist. Ein gutes Beispiel dafür ist das Surfactin, welches zwar antibakteriell ist, dessen Primärfunktion aber wohl in der Ermöglichung der Biofilmbildung liegt (31). Weiterhin fungieren die Lantibiotika Subtilin und Ericin, die beide in einem Zwei-Komponenten-Regulationssystem autoreguliert sind, als Pheromone im "Quorum Sensing" (31).

Der 112 AS lange Präkursor von Amylocyclicin A wird mit Hilfe der Modifikations- und Export- Proteine als zirkuläres 64 AS langes Peptid ausgeschleust.

So gut wie alle natürlichen Produkte, die ribosomal hergestellt werden, weisen zusätzlich zu dem C-terminalen Kernpeptid, das modifiziert wird, eine N-terminale Leader-Erweiterung auf. Die Rolle der meisten **Leader-Peptide** liegt in der Funktion als Sekretionssignal. Die Leader-Peptide der Bacteriocine zeigen jedoch keine Homologie zu denen der typischen Sec- und Doppel-Arginin Translokationswege für den Export von Proteinen durch die Membran (70).

Neben der Funktion im Export können die Leader-Peptide Erkennungsmotive für posttranslationale Modifikationsenzyme enthalten.

Weitere mögliche Funktionen der Leader-Peptide liegen in der Hilfestellung der Faltung der Präkursor-Peptide, im Schutz des Präkursors vor Degradation sowie das Präkursor-Peptid innerhalb der Zelle inaktiv zu halten, bis es sekretiert wird (70). Die Funktion der Leader-Peptide differiert dabei von Klasse zu Klasse und mitunter auch innerhalb einer Gruppe.

Das Leader-Peptid von Amylocyclicin A weist keine konservierten Sequenzen auf, die als Erkennungsstelle für eine Protease dienen könnten. Das Leader-Peptid von Uberolysin ist nur sechs AS lang und das von Amylocyclicin A 48 AS, jedoch scheinen beide an der gleichen Stelle abgespalten zu werden. Die 3D-Struktur könnte an der Erkennung durch die Enzyme beteiligt sein, wie es für Carnocyclin A als Möglichkeit beschrieben wurde. Die Funktion der Leader-Peptide der zirkulären Bacteriocine und mit welchen Mechanismus sie abgespalten werden, bleibt vorerst unbekannt.

Für Microcin B17 wurde beschrieben, dass das Leader-Peptid für den Export nicht notwendig ist, sondern als Erkennungsstelle für die Modifikationsenzyme dient (23).

Das „Docking Scaffold“-Protein könnte bei Plantazolicin, wie auch bei Microcin B17, das Leader-Peptid binden. Im Fall von MccB17 und ähnlichen Peptiden ermöglicht ein Poly-Glycin-Linker die korrekte Positionierung des Peptides innerhalb des Komplexes.

Da Plantazolicin, wie auch Streptolysin, keinen Poly-Glycin-Linker aufweist, funktioniert die Biosynthese eventuell etwas anders als in dem Modell für MccB17 vorgeschlagen (23). Für Streptolysin S wurde beschrieben, dass der Präkursor nicht an das Docking-Protein bindet, sondern an die Cyclodehydratase. Der Streptolysin S-Präkursor besitzt vermutlich schon Aktivität und eine Bindung an die Cyclodehydratase würde die Ausübung der biologischen Aktivität verhindern (70).

Im Gegensatz zu den meisten Thiopeptiden besitzen die Microcine aus der TOMM-Gruppe kein Doppel-Glycin im Präpeptid, nach dem das Leader-Peptid abgespalten werden könnte (70). Das Leader-Peptid des TOMM-Peptides Plantazolicin ähnelt demnach eher dem der Thiopeptide. Die vermutliche Schnittstelle liegt nach einem Doppel-Alanin. Neben einer Spaltung nach einem Doppel-Glycin können statt dessen auch andere kleine Aminosäuren wie Serin oder Alanin vorkommen (21, 71, 89).

Wie auch in anderen Systemen sind die Leader-Peptide der Thiopeptide reich an Aspartat und Glutamat und besitzen hoch konservierte hydrophobe Reste (70). Die Aufgabe der Thiopeptid-Leader ist noch unbekannt, vermutlich haben sie jedoch auch eine Funktion in der posttranslationalen Modifikation.

Auch für Plantazolicin ist noch unbekannt welche Rolle das Leader-Peptid im Export bzw. in der Bindung der Cyclodehydratase oder des „Docking Scaffold“-Proteins spielt. Weitere Untersuchungen sind hierfür notwendig.

Essentiell für die **Selbst-Immunität** ist meist ein Immunitätsprotein. Dieses kodieren auch viele Gencluster der zirkuläre Bacteriocine. Im Amylocyclicin A-Cluster ist dieses Gen *acnE*.

Die genaue Wirkungsweise der Immunitätsproteine ist aber noch unbekannt. Eventuell können sie mit der Bacteriocin-induzierten Pore interagieren und sie schließen, oder mit einem Bacteriocin-Rezeptor interagieren, wobei die volle Immunität oft von der Koexistenz eines ergänzenden ABC-Systems mit spezifischer Sekretions- und Immunitäts-Funktion abhängt (22, 58).

Dies scheint auch bei Amylocyclicin A der Fall zu sein. Wesentlich für die Immunität sind das Membranprotein AcnB, das Immunitätsprotein AcnE und der ABC-Transporter.

Die Mutation des ABC-Transporters scheint letal zu sein, jedoch kann es nicht ausgeschlossen werden, dass es andere Gründe hatte, warum für *acnD* und *acnC* keine Mutanten erstellt werden konnten.

Die Aufgabe des Proteins AcnF bleibt ungelöst. Dieses Protein scheint an der Synthese von Amylocyclicin A, aber nicht an der Immunität beteiligt zu sein. Schwache Homologien finden sich zu einer Protease, einem ATP-Transporter-Protein und Regulatoren. Aufgrund dessen, dass im Uberolysin Cluster ein *ORF1*-Gen existiert, das für ein ComE-ähnliches Protein (Response Regulator) kodiert, ist eine Funktion als **Regulator** denkbar.

In *Streptococcus mutans* wird die Synthese des Bacteriocins Mutacin (nlmC) durch ein ComED Zwei-Komponentensystem kontrolliert, wobei ComE an die Promotorregion bindet und die Transkription ermöglicht (47). ORF1 von *Streptococcus uberis* zeigt Homologie zu der LytR-Familie von Response-Regulatoren. In der Nachbarschaft gibt es keine dazugehörige Sensorkinase (95). LytR-Familie Regulatoren gibt es auch bei anderen Bacteriocinen wie BlpR von *Streptococcus pneumoniae*, EntR von *Enterococcus faecium*, Butyriovibriocin und Circularin A (95). Falls es sich bei AcnF um einen Regulator handelt, würde auch hier der dazugehörige Partner des Zwei-Komponentensystems fehlen.

Eine Rolle als Regulator scheint am wahrscheinlichsten, jedoch besitzt AcnF sechs vorhergesagte Transmembranhelices, so dass es wohl eher eine Funktion in der Reifung oder dem Export ausübt.

Eine weitere Rolle in der Amylocyclicin A-Regulation scheint DegU zu spielen. Die *degU*-Mutante RSpMarA2 kann Amylocyclicin A nicht mehr herstellen (Abbildungen 15 und 52B). Zu vermuten wäre demzufolge eine positive Regulation der Amylocyclicin A-Synthese durch DegU.

DegU ist ein Response Regulator mit der Konsensussequenz TAAAT, der mit der dazugehörigen Kinase DegS ein Zwei-Komponentensystem bildet und viele Prozesse der post-exponentiellen Phase reguliert (69, 83).

DegU kontrolliert die Expression degradativer Enzyme (49, 64), ist an der Initiation der Kompetenz beteiligt (17, 29), an der osmotischen Antwort auf Salzstress (18, 48) und auch an der positiven Kontrolle der Bacillomycin D-Produktion in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (46). Bacillomycin D ist ein antifungales Lipopeptid, welches in der stationären Phase hergestellt wird und dessen Produktion von DegU-P abhängig ist (46).

Phosphoryliertes DegU (DegU-P) reguliert über 120 Gene. Es kann direkt die degradative Enzymproduktion aktivieren und die Beweglichkeit hemmen, wohingegen für unphosphoryliertes DegU nur relativ wenige Funktionen bekannt sind. Es kann beispielsweise direkt die Kompetenz stimulieren, indem es an den ComK-Promotor bindet (17, 29).

Da es jedoch keine putativen DegU-Bindestellen in dem Promotorbereich des *Acn*-Operons gibt, ist eine genaue Interpretation der DegU-Abhängigkeit schwierig.

Die Regulation der Amylocyclicin A-Synthese ist vermutlich sehr komplex. Um den Regulationsmechanismus aufzudecken, sind umfangreiche Promotoranalyseexperimente notwendig.

Im Gegensatz zu der eventuell positiven Regulation des *Acn*-Operons durch DegU, besteht bei der Plantazolicin-Synthese die Möglichkeit der negativen Regulation durch DegU. DegU kann sowohl als negativer, als auch positiver Regulator, auftreten.

Die *degU*-Mutante RSpMarA2 stellt ein Vielfaches der Menge des Wildtyps an Plantazolicin her. Eine negative Regulation der Synthese durch DegU ist aufgrund vorhandener putativer DegU-Bindestellen im Promotorbereich von *pznA* und dem Biosyntheseoperon *pznJ,C,D,B,E,L* somit grundsätzlich möglich.

Das Export- und Immunitäts-Operon *pznF,K,G,H,I* besitzt keine putativen DegU-Bindestellen. Die Immunität gegenüber dem selbst hergestellten oder von anderen Bakterien synthetisierten Plantazolicin sicherzustellen, wäre durchaus sinnvoll.

RSpMarA2 zeigt in RT-PCR-Experimenten jedoch keine erhöhte Transkriptionsrate der *pzn*-Gene (Korrespondenz Mitchell Lab.), so dass die Regulation durch DegU noch ungeklärt bleibt.

Zu vermuten ist jedoch eine Regulation durch PznK, den putativen Repressor des Clusters, dessen Bindestellen und genaue Wirkungsweise jedoch noch unbekannt sind.

Eine bekannte Gruppe der Bacteriocine der grampositiven Bakterien sind die **Lantibiotika**, die, wie die Microcine, ribosomal als Peptidpräkursor hergestellt und dann posttranslational stark modifiziert werden, um die biologisch aktive Form zu erhalten (35). Sie enthalten Lanthionin oder Methyllanthionin, die für eine erhöhte Stabilität verantwortlich sein könnten. Dabei werden in einem ersten Schritt Serin und/oder Threonin durch ein LanB-Protein zu 2,3-Didehydroamino-säuren dehydratisiert und einem zweiten Schritt wird durch ein LanC-Protein die Thiol-Gruppe eines benachbarten Cysteins an die entstandene Doppelbindung hinzugefügt.

Weitere mögliche Modifizierungen zeigen sich im Entstehen von z. B. Lysinoalanin, Lanthionin-Sulfoxid, D-Alanin oder Allo-Isoleucin. Der bekannteste Vertreter ist das oben schon erwähnte Nisin.

Lantibiotika werden auch von *Bacillus subtilis* produziert, einem *Bacillus amyloliquefaciens* verwandten Modellorganismus. *Bacillus subtilis* kann mehr als 24 Antibiotika, mit einer großen Anzahl verschiedener Strukturen, herstellen (85).

Zu den von *Bacillus subtilis* produzierten Lantibiotika zählen beispielsweise das 32-Aminosäuren beinhaltende pentazyklische Subtilin, weiterhin Ericin, das sich nur in vier Aminosäuren von Subtilin unterscheidet, sowie Mersacidin.

Von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 ist keine Produktion von Lantibiotika bekannt. Jedoch ist zu bemerken, dass im Genom Gene für eine Immunität gegenüber Subtilin und Mersacidin (*spaF*, *spaG*, *spaE*, *mrsF*, *mrsG*, *mrsE*) und deren Regulation (*spaR*, *spaK*, *mrsK2*, *mrsR2*,) vorhanden sind.

Weiterhin ist das Subtilosin assoziierte-Gen *albG* im Genom vorhanden, das jedoch ohne die dazugehörigen Struktur- und Transport-Gene auftritt. Subtilosin A sowie Sublancin 168 besitzen für Lantibiotika ungewöhnlichen Strukturen, beispielsweise zwei Disulfidbrücken bei Sublancin 168.

Plantazolicin wird, wie die Lantibiotika oder Microcine, ribosomal als Präkursor synthetisiert, und dann modifiziert. Die Thiazol/Oxazol-modifizierten Microcine werden sowohl von grampositiven, als auch von gramnegativen Bakterien und Archäen gebildet (53). Für *Bacillus subtilis* ist kein Produkt der TOMM-Gruppe bekannt, für *Bacillus thuringensis* wird ein Produkt vermutet (53).

Sämtliche **TOMM-Biosynthesecluster** kodieren für ein Protoxin sowie die Enzyme für die Einführung der Thiazol- und Oxazol-Ringe. Der Synthesekomplex hat teilweise eine geringe Substratspezifität, wie es für PagBCD und McbBCD beschrieben wurde (53). Dementsprechend könnte untersucht werden, ob der PznBCD Komplex auch andere Protoxine als PznA modifizieren kann.

ABC-Transporter sind nicht bei allen Vertretern vorhanden, wie beispielsweise bei *T. erythraeum* und *P. didemni*. Statt dessen besitzen sie eine Serin-Protease, die eine Kopf-Schwanz-Verknüpfung einführen könnte, was zur Entstehung eines kleinen Toxins führt, das keinen extra ABC-Transporter für die Ausschleusung benötigt (53).

Auch Proteasen sind ebenfalls nicht in allen Clustern vertreten. Bei Microcin B17 wird z. B. die chromosomal kodierte Protease TldE/TldD zum Abspalten des Leader-Peptids genutzt.

Das Plantazolicin-TOMM-Cluster beinhaltet sowohl einen ABC-Transporter, als auch eine Protease. Als Modifikation besitzt Plantazolicin neben den vermutlichen zehn Oxazol(in) bzw. (Methyl)Thiazol(in)-Ringene zwei Methylgruppen, die durch die Methyltransferase PznL eingeführt werden. An welcher Stelle sich genau diese Methylgruppen befinden ist noch unbekannt. Um dies zu klären, wären Aminosäureaustauschexperimente nötig bzw. eine Strukturaufklärung.

PznJ führt vermutlich eine weitere bisher unbekannte Modifikation ein. PznJ-Homologe finden sich nicht in den Clustern von anderen Vertretern der TOMM-Gruppe.

Aufgrund der schwachen Homologien zu Oxidoreduktasen und Proteinen aus der Nmr-Familie, zu der auch Dehydrogenasen/Reduktasen gehören (84), ist eine zusätzliche Verbrückung denkbar. Die tatsächliche Funktion des Gens läßt sich aber vermutlich erst anhand der Struktur bestimmen.

Neben den bekannten nicht-ribosomal hergestellten Substanzen, ist jetzt auch für *Bacillus amyloliquefaciens* die Synthese ribosomal hergestellter antibakterieller Produkte mit den dazugehörigen Genclustern nachgewiesen.

Aufgrund der Tatsache, dass es noch ungeklärte antibakterielle Aktivitäten gibt, sowie auffällige Massen in MALDI-TOF-MS Spektren, ist von noch weiteren produzierten Bacteriocinen auszugehen.

Weiterhin denkbar ist auch eine nicht-ribosomale Synthese, ohne Megasyntasekomplexe wie PKS oder NRPS, von Substanzen wie z.B. 3,3-Neotrehalosadiamin (34), dem Phospholipid Bacilysocin (86) oder der phenolischen Substanz Amicoumacin (74).

Im Jahr 2006 beschrieben Butcher und Helmann, dass der extrazytoplasmatische **Sigma-Faktor SigW** in *Bacillus subtilis* Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen von anderen *Bacillen* vermittelt. 30 SigW abhängige Operons wurden untersucht.

Das SigW abhängige Operon *ydbST* und das *fosB*-Gen vermitteln dabei speziell Resistenz gegenüber Substanzen, die *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 herstellt (6).

Die *ydbST*-Gene kodieren für Membranproteine mit unbekannter Funktion. Eventuell handelt es sich um membrangebundene Bacteriocin-Resistenzgene (6). Aufgrund der Homologie zu Genen auf einem Plasmid von *Staphylococcus aureus*, das für Aureocin

A53 und die Selbst-Immunität kodiert, wird eine Aureocin A53-ähnliche Substanz vermutet. Die Autoren konnten jedoch keine solche Substanz in *B. amyloliquefaciens* FZB42 finden.

Aureocin A53 ist ein unmodifiziertes Peptid und wird ohne Leader-Peptid hergestellt (66). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass YdbST recht spezifisch für die Resistenz gegenüber Amylocyclicin A zuständig ist, da die *Bacillus subtilis ydbST* Mutante fast annähernd die gleiche Sensitivität gegenüber Amylocyclicin A aufweist wie die *sigW*-Mutante.

FZB42 besitzt ebenfalls *ydbST*-Gene, jedoch befinden sich diese nicht im Amylocyclicin A-Operon. Das legt die Vermutung nahe, dass das *ydbST*-Operon *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *Bacillus subtilis* resistent gegenüber Aureocin A53 und ähnlichen, auch zirkulären, Bacteriocinen macht.

Die *sigW*-Mutante von *Bacillus subtilis* ist im Gegensatz zur *ydbST*-Mutante auch noch gegen zusätzlich eine oder mehrere andere antibakterielle Substanzen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 sensitiv.

Butcher und Helmann postulierten eine durch *B. amyloliquefaciens* FZB42 hergestellte Fosfomycin-ähnliche Substanz. Die *fosB*-Mutante von *Bacillus subtilis* zeigte im Spot-on-lawn Test mit der Amylocyclicin A-Mutante jedoch keine erhöhte Sensitivität gegenüber einer von *B. amyloliquefaciens* FZB42 hergestellten Substanz; das heißt, dass es in diesem Test keinen Hinweis auf eine Fosfomycin-ähnliche Substanz gab und es sich also um eine andere Substanz handeln muss.

Möglicherweise handelt es sich um eine der unbekannten vermutlich peptidartigen Verbindungen, die *B. amyloliquefaciens* FZB42 herstellt.

Das 138 Da große Fosfomycin aus *Streptomyces* wirkt auch gegen das gramnegative Bakterium *E.coli*. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 besitzt keine Fosfomycin-Synthesegene, dafür aber ein *fosB*-Resistenzgen wie auch *Bacillus subtilis*.

Plantazolicin und Amylocyclicin A sind zwei weitere Substanzen unter den in letzter Zeit entdeckten antibakteriellen Produkten von Bakterien. Durch gezielte Veränderungen der Peptidstrukturen und eine fortschreitende Sequenzierung von Genomen, werden immer mehr antibakterielle Substanzen bekannt werden, die möglicherweise eine Rolle in der Medizin als Ersatz der konventionellen Antibiotika spielen könnten. Außerdem könnten völlig neue Klassen identifiziert werden. Die Entdeckung, dass Microcine nicht nur durch Enterobakterien produziert werden und bei der Synthese von Thiopeptiden auch

Modifizierungen der Microcine sowie der Lantibiotika vollführt werden (68), zeigt, dass in Bezug auf die Klassifizierung der immer größer werdenden Gruppe an antimikrobiellen Substanzen noch viele Fragen offen sind.

Literaturverzeichnis

1. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-10.
2. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-402.
3. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23.
4. **Brogden, K. A.** 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**:238-50.
5. **Busenlehner, L. S., M. A. Pennella, and D. P. Giedroc.** 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **27**:131-43.
6. **Butcher, B. G., and J. D. Helmann.** 2006. Identification of *Bacillus subtilis* sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by *Bacilli*. *Mol Microbiol.* **60**:765-82.
7. **Chen, X. H.** 2009. Whole genome analysis of the plant growth-promoting Rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 with focus on its secondary metabolites. Dissertation. HU-Berlin.
8. **Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, and R. Borriss.** 2009. More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **16**:14-24.
9. **Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, A. Eisenreich, K. Schneider, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, B. Voss, W. R. Hess, O. Reva, H. Junge, B. Voigt, P. R. Jungblut, J. Vater, R. Süssmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk, and R. Borriss.** 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol.* **25**:1007-14.
10. **Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, R. Süssmuth, J. Piel, and R. Borriss.** 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol.* **140**:27-37.
11. **Chen, X. H., R. Scholz, M. Borriss, H. Junge, G. Mogel, S. Kunz, and R. Borriss.** 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol.* **140**:38-44.
12. **Chen, X. H., J. Vater, J. Piel, P. Franke, R. Scholz, K. Schneider, A. Koumoutsis, G. Hitzeroth, N. Grammel, A. W. Strittmatter, G. Gottschalk, R. D. Süssmuth, and R. Borriss.** 2006. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J Bacteriol.* **188**:4024-36.
13. **Choudhary, D. K., and B. N. Johri.** 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants-with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol Res* **164**:493-513.
14. **Cole, C., J. D. Barber, and G. J. Barton.** 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* **36**:W197-201.
15. **Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3**:777-88.

16. **Cutting, S. M., and P. B. Van der Horn.** 1990. Genetic analysis in molecular biology methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd.
17. **Dahl, M. K., T. Msadek, F. Kunst, and G. Rapoport.** 1992. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **267**:14509-14.
18. **Dartois, V., M. Debarbouille, F. Kunst, and G. Rapoport.** 1998. Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**:1855-61.
19. **Datta, V., S. M. Myskowski, L. A. Kwinn, D. N. Chiem, N. Varki, R. G. Kansal, M. Kotb, and V. Nizet.** 2005. Mutational analysis of the group A streptococcal operon encoding streptolysin S and its virulence role in invasive infection. *Mol Microbiol* **56**:681-95.
20. **Diaz, M., E. Valdivia, M. Martinez-Bueno, M. Fernandez, A. S. Soler-Gonzalez, H. Ramirez-Rodrigo, and M. Maqueda.** 2003. Characterization of a new operon, as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl Environ Microbiol* **69**:1229-36.
21. **Dirix, G., P. Monsieurs, K. Marchal, J. Vanderleyden, and J. Michiels.** 2004. Screening genomes of Gram-positive bacteria for double-glycine-motif-containing peptides. *Microbiology* **150**:1121-6.
22. **Drider, D., G. Fimland, Y. Hechard, L. M. McMullen, and H. Prevost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:564-82.
23. **Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, and S. Rebuffat.** 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* **24**:708-34.
24. **Fairbanks, G., T. L. Steck, and D. F. Wallach.** 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**:2606-17.
25. **Galvez, A., M. Maqueda, M. Martinez-Bueno, and E. Valdivia.** 1991. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol* **173**:886-92.
26. **Galvez, A., M. Maqueda, E. Valdivia, A. Quesada, and E. Montoya.** 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can J Microbiol* **32**:765-71.
27. **Gong, X., L. A. Martin-Visscher, D. Nahirney, J. C. Vederas, and M. Duszyk.** 2009. The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1788**:1797-803.
28. **Haft, D. H., M. K. Basu, and D. A. Mitchell.** 2010. Expansion of ribosomally produced natural products: a nitrile hydratase- and NifH-related precursor family. *BMC Biol* **8**:70.
29. **Hamoen, L. W., A. F. Van Werkhoven, G. Venema, and D. Dubnau.** 2000. The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9246-51.
30. **Hancock, R. E., and G. Diamond.** 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* **8**:402-10.
31. **Hofemeister, J., B. Conrad, B. Adler, B. Hofemeister, J. Feesche, N. Kucheryava, G. Steinborn, P. Franke, N. Grammel, A. Zwintscher, F. Leenders, G. Hitzeroth, and J. Vater.** 2004. Genetic analysis of the biosynthesis

- of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol Genet Genomics* **272**:363-78.
32. **Horton, R. M., Z. L. Cai, S. N. Ho, and L. R. Pease.** 1990. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**:528-35.
33. **Idris, E. E., D. J. Iglesias, M. Talon, and R. Borriss.** 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe Interact* **20**:619-26.
34. **Inaoka, T., T. Satomura, Y. Fujita, and K. Ochi.** 2009. Novel gene regulation mediated by overproduction of secondary metabolite neotrehalosadiamine in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **291**:151-6.
35. **Jack, R. W., and G. Jung.** 2000. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Curr Opin Chem Biol* **4**:310-7.
36. **Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* **59**:171-200.
37. **Jones, K. L.** 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J Bacteriol* **57**:141-5.
38. **Kalmokoff, M. L., T. D. Cyr, M. A. Hefford, M. F. Whitford, and R. M. Teather.** 2003. Butyrivibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. *Can J Microbiol* **49**:763-73.
39. **Kalmokoff, M. L., and R. M. Teather.** 1997. Isolation and characterization of a bacteriocin (Butyrivibriocin AR10) from the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-like activity among ruminal isolates of *B. fibrisolvens*. *Appl Environ Microbiol* **63**:394-402.
40. **Kawai, Y., Y. Ishii, K. Arakawa, K. Uemura, B. Saitoh, J. Nishimura, H. Kitazawa, Y. Yamazaki, Y. Tatenno, T. Itoh, and T. Saito.** 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* **70**:2906-11.
41. **Kawai, Y., T. Saito, H. Kitazawa, and T. Itoh.** 1998. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**:2438-40.
42. **Kawulka, K., T. Sprules, R. T. McKay, P. Mercier, C. M. Diaper, P. Zuber, and J. C. Vederas.** 2003. Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J Am Chem Soc* **125**:4726-7.
43. **Kelly, W. L., L. Pan, and C. Li.** 2009. Thiostrepton biosynthesis: prototype for a new family of bacteriocins. *J Am Chem Soc* **131**:4327-34.
44. **Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. Kuipers, and J. Kok.** 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol* **69**:1589-97.
45. **Koumoutsi, A., X. H. Chen, A. Henne, H. Liesegang, G. Hitzeroth, P. Franke, J. Vater, and R. Borriss.** 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol.* **186**:1084-96.

46. **Koumoutsis, A., X. H. Chen, J. Vater, and R. Borriss.** 2007. DegU and YczE positively regulate the synthesis of bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Appl Environ Microbiol* **73**:6953-64.
47. **Kreth, J., D. C. Hung, J. Merritt, J. Perry, L. Zhu, S. D. Goodman, D. G. Cvitkovitch, W. Shi, and F. Qi.** 2007. The response regulator ComE in *Streptococcus mutans* functions both as a transcription activator of mutacin production and repressor of CSP biosynthesis. *Microbiology* **153**:1799-807.
48. **Kunst, F., and G. Rapoport.** 1995. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:2403–2407.
49. **Kunst, F., M. Pascal, J. Lepesant-Kejzlarova, J. A. Lepesant, A. Billault, and R. Dedonder.** 1974. Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the syntheses of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochimie* **56**:1481-9.
50. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
51. **Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947-8.
52. **Le Breton, Y., N. P. Mohapatra, and W. G. Haldenwang.** 2006. In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon. *Appl Environ Microbiol* **72**:327-33.
53. **Lee, S. W., D. A. Mitchell, A. L. Markley, M. E. Hensler, D. Gonzalez, A. Wohlrab, P. C. Dorrestein, V. Nizet, and J. E. Dixon.** 2008. Discovery of a widely distributed toxin biosynthetic gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5879-84.
54. **Leer, R. J., J. M. van der Vossen, M. van Giezen, J. M. van Noort, and P. H. Pouwels.** 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* **141** (Pt 7):1629-35.
55. **Li, Y. M., J. C. Milne, L. L. Madison, R. Kolter, and C. T. Walsh.** 1996. From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* **274**:1188-93.
56. **Liao, R., L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, and W. Liu.** 2009. Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications. *Chem Biol* **16**:141-7.
57. **Liu, C.-I., D. C. Manker, A. M. Macmullan, P. A. Lufburrow, and R. L. Starnes.** 2003. Novel pesticidal composition and ϕ (*Bacillus thuringiensis*) strain.
58. **Maqueda, M., M. Sanchez-Hidalgo, M. Fernandez, M. Montalban-Lopez, E. Valdivia, and M. Martinez-Bueno.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **32**:2-22.
59. **Martin-Visscher, L. A., X. Gong, M. Duszyk, and J. C. Vederas.** 2009. The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J Biol Chem.* **284**:28674-81.
60. **Martin-Visscher, L. A., M. J. van Belkum, S. Garneau-Tsodikova, R. M. Whittall, J. Zheng, L. M. McMullen, and J. C. Vederas.** 2008. Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl Environ Microbiol* **74**:4756-63.
61. **Martinez-Bueno, M., E. Valdivia, A. Galvez, J. Coyette, and M. Maqueda.** 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* **27**:347-58.

62. **Mitchell, D. A., S. W. Lee, M. A. Pence, A. L. Markley, J. D. Limm, V. Nizet, and J. E. Dixon.** 2009. Structural and functional dissection of the heterocyclic peptide cytotoxin streptolysin S. *J Biol Chem* **284**:13004-12.
63. **Morris, R. P., J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt, and P. Krastel.** 2009. Ribosomally synthesized thiopeptide antibiotics targeting elongation factor Tu. *J Am Chem Soc* **131**:5946-55.
64. **Msadek, T., F. Kunst, D. Henner, A. Klier, G. Rapoport, and R. Dedonder.** 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in degS and degU. *J Bacteriol* **172**:824-34.
65. **Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol* **189**:1189-98.
66. **Netz, D. J., R. Pohl, A. G. Beck-Sickinger, T. Selmer, A. J. Pierik, C. Bastos Mdo, and H. G. Sahl.** 2002. Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol* **319**:745-56.
67. **Nissen-Meyer, J., and I. F. Nes.** 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol* **167**:67-77.
68. **Nolan, E. M., and C. T. Walsh.** 2009. How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics. *Chembiochem* **10**:34-53.
69. **Ogura, M., and K. Tsukahara.** Autoregulation of the *Bacillus subtilis* response regulator gene degU is coupled with the proteolysis of DegU-P by ClpCP. *Mol Microbiol* **75**:1244-59.
70. **Oman, T. J., and W. A. van der Donk.** 2009. Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat Chem Biol* **6**:9-18.
71. **Oman, T. J., and W. A. van der Donk.** 2009. Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin. *ACS Chem Biol* **4**:865-74.
72. **Papagianni, M.** 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv* **21**:465-99.
73. **Pei, J., and N. V. Grishin.** 2001. Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends Biochem Sci* **26**:275-7.
74. **Pinchuk, I. V., P. Bressollier, I. B. Sorokulova, B. Verneuil, and M. C. Urdaci.** 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Res Microbiol* **153**:269-76.
75. **Rigali, S., A. Derouaux, F. Giannotta, and J. Dusart.** 2002. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem* **277**:12507-15.
76. **Rodriguez-Martinez, J. M., A. Briales, C. Velasco, M. C. Conejo, L. Martinez-Martinez, and A. Pascual.** 2009. Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS. *J Antimicrob Chemother* **63**:1128-34.
77. **Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
78. **Schägger, H., and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**:368-79.

79. **Schmidt, E. W., J. T. Nelson, D. A. Rasko, S. Sudek, J. A. Eisen, M. G. Haygood, and J. Ravel.** 2005. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:7315-20.
80. **Scholz, R., K. J. Molohon, J. Nachtigall, J. Vater, A. L. Markley, R. D. Sussmuth, D. A. Mitchell, and R. Borriss.** 2011. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol* **193**:215-24.
81. **Scholz, R., Z. Wang, J. Vater, Y. He, and R. Borriss.** 2010. Amylocyclicin A, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. in progress.
82. **Sedgley, C. M., D. B. Clewell, and S. E. Flannagan.** 2009. Plasmid pAMS1-encoded, bacteriocin-related "Siblicide" in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **191**:3183-8.
83. **Sierro, N., Y. Makita, M. de Hoon, and K. Nakai.** 2008. DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. *Nucleic Acids Res* **36**:D93-6.
84. **Stammers, D. K., J. Ren, K. Leslie, C. E. Nichols, H. K. Lamb, S. Cocklin, A. Dodds, and A. R. Hawkins.** 2001. The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *Embo J* **20**:6619-26.
85. **Stein, T.** 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**:845-57.
86. **Tamehiro, N., Y. Okamoto-Hosoya, S. Okamoto, M. Ubukata, M. Hamada, H. Naganawa, and K. Ochi.** 2002. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:315-20.
87. **Thompson, J. D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673-80.
88. **Toba, T., S. K. Samant, E. Yoshioka, and T. Itoh.** 1991. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *Lett Appl Microbiol* **13**:281-286.
89. **van Belkum, M. J., R. W. Worobo, and M. E. Stiles.** 1997. Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **23**:1293-301.
90. **Vater, J., B. Kablitz, C. Wilde, P. Franke, N. Mehta, and S. S. Cameotra.** 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl Environ Microbiol* **68**:6210-9.
91. **Vetting, M. W., S. S. Hegde, J. E. Fajardo, A. Fiser, S. L. Roderick, H. E. Takiff, and J. S. Blanchard.** 2006. Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* **45**:1-10.
92. **Viklund, H., and A. Elofsson.** 2008. OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics* **24**:1662-8.
93. **Wieland Brown, L. C., et al.** 2009. Thirteen posttranslational modifications convert a 14-residue peptide into the antibiotic thiocillin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2549-53.

94. **Wilkins, M. R., E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser.** 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* **112**:531-52.
95. **Wirawan, R. E., K. M. Swanson, T. Kleffmann, R. W. Jack, and J. R. Tagg.** 2007. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology*. **153**:1619-30.
96. **Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh.** 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5046-54.
97. **Zheng, G., R. Hehn, and P. Zuber.** 2000. Mutational analysis of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis*: identification of genes required for subtilosin production and immunity. *J Bacteriol* **182**:3266-73.

Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Durchführung der Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Rainer Borriss danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation in der AG Bakteriengenetik und die Betreuung meiner Promotionsarbeit.

Prof. Dr. Roderich Süßmuth danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Dank geht weiterhin an alle Kooperationspartner, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben: Dr. Joachim Vater für die MALDI-TOF-MS Messungen, für die Begutachtung dieser Arbeit, sowie seine Hilfsbereitschaft und Ratschläge besonders in der Endphase der Promotion. Jonny Nachtigall für die HLPC-ESI-MS Messungen und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte. Dr. Dörte Becher für das große Engagement in Bezug auf die Peptidsequenzierungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Zhiyuan Wang für die Mutanten WY01 und WY06 und allen Mitgliedern der AG Bakteriengenetik.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während der gesamten Arbeit unterstützt haben.

Publikationsliste

- Scholz, R., K. J. Molohon, J. Nachtigall, J. Vater, A. L. Markley, R. D. Sussmuth, D. A. Mitchell, and R. Borriss. 2011. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol* **193**:215-24.
- Scholz, R., Z. Wang, J. Vater, Y. He, and R. Borriss. 2011. Amylocyclicin A, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. in progress.
- Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, and R. Borriss. 2009. More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **16**:14-24.
- Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, A. Eisenreich, K. Schneider, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, B. Voss, W. R. Hess, O. Reva, H. Junge, B. Voigt, P. R. Jungblut, J. Vater, R. Süssmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk, and R. Borriss. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol*. **25**:1007-14.
- Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, R. Sussmuth, J. Piel, and R. Borriss. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol*. **140**:27-37.
- Chen, X. H., R. Scholz, M. Borriss, H. Junge, G. Mogel, S. Kunz, and R. Borriss. 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol*. **140**:38-44.
- Chen, X. H., J. Vater, J. Piel, P. Franke, R. Scholz, K. Schneider, A. Koumoutsis, G. Hitzeroth, N. Grammel, A. W. Strittmatter, G. Gottschalk, R. D. Sussmuth, and R. Borriss. 2006. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J Bacteriol*. **188**:4024-36.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt zu haben. Ich habe keine unerlaubten sowie unerwähnten Hilfen benutzt.

Berlin, den 29.08.2010